

Hormonsensitive molekulare Mechanismen der Entwicklung des Gesangssystems

Benjamin Wasmer

Hormonsensitive molekulare Mechanismen der Entwicklung des Gesangssystems

Dissertation

Fakultät für Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Durchgeführt am
Max-Planck-Institut für Ornithologie
Seewiesen

Eingereicht von
Benjamin Wasmer

Februar 2015

Erstgutachter:	Prof. Dr. Manfred Gahr
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Benedikt Grothe

Tag der Abgabe:	5.02.2015
-----------------	-----------

Tag der mündlichen Prüfung:	16.10.2015
-----------------------------	------------



*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuerwerfen.“*

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung.....	5
2. Einleitung	9
2.1. Der Zebrafink als Modellorganismus.....	9
2.2. Das Zeitalter der „-omics“	10
2.3. Die Gesangsentwicklung des männlichen Zebrafinken	11
2.4. Das neuronale Korrelat für den Gesang: Das Gesangssystem	13
2.4.1. Die Neuroanatomie des Gesangssystems.....	13
2.4.1.1. Die Prämotorischen Bahn (PMB)	14
2.4.1.2. Die Anteriore Vorderhirnschleife (AVS)	15
2.5. Die Funktionalität des HVC	16
2.6. Das Gesangssystem und die Rolle von Östradiol	16
2.6.1. Der Sexualdimorphismus	16
2.6.2. Genetische Basis des Sexualdimorphismus	17
2.6.3. Die Rolle von Östrogen für Sexualdimorphismus	18
2.6.4. Wo wird neuronal aktives Östradiol gebildet	19
2.7. Der Östrogenrezeptor im Gesangssystem	20
2.8. Der Microarray	21
2.9. Bioinformatik	23
2.10. Fragestellungen der Arbeit	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Materialien	25
3.2. Tierhaltung.....	27
3.2.1. Rechtliche Grundlagen.....	27
3.2.2. Versuchstiere.....	27
3.2.3. Nestkontrolle und Beringung	28

3.3. Laborarbeiten	29
3.3.1. Hormonimplantate.....	29
3.3.1.1. Herstellung	29
3.3.1.2. Implantation	29
3.3.2. Geschlechtsbestimmung bei Zebrafinken	30
3.3.3. Analyse der Hormontiter	31
3.3.4. Gewebeentnahme	34
3.3.5. HVC-Präparation	34
3.3.6. Extraktion der RNA.....	36
3.3.7. Bestimmung der RNA – Qualität und – Quantität.....	37
3.3.8. RNA Amplifikation und Hybridisierung der Microarray-Chips.....	37
3.3.9. Microarray Analyse	38
3.3.10. Rohdatenprozessierung.....	38
3.3.11. Statistik	39
3.3.12. Aufbereitung der Genexpressionsdaten.....	40
4. Ergebnisse.....	49
4.1. Entwicklungsstudie.....	49
4.1.1. Korrelationsanalyse der Entwicklungsgruppen	49
4.1.2. Anzahl der regulierten Gene	52
4.1.3. Schnittmengen der Entwicklungsgruppen.....	53
4.1.4. Kanonische Signalwege in den Entwicklungsgruppen.....	56
4.1.4.1. Stark überrepräsentierte kanonische Signalwege in den Entwicklungsgruppen.....	56
4.1.4.2. Expressionsmuster kanonischer Signalwege in den Entwicklungsgruppen	58
4.1.4.3. Vergleich kanonischer Signalwege ähnlicher Entwicklungsgruppen.....	60
4.1.5. Biologische Prozesse der Entwicklungsgruppen.....	61
4.1.6. Am stärksten regulierte Gene in den Entwicklungsgruppen	65
4.1.7. Neurotransmitterrezeptoren codierende Gene in den Entwicklungsgruppen.....	72
4.1.7.1. Glutamaterezeptoren	72
4.1.7.2. GABA- und Glycinrezeptoren.....	73
4.1.7.3. Acetylcholinrezeptoren.....	75
4.1.7.4. Rezeptoren katecholaminerger Neurotransmitter	77
4.1.8. Zusammenfassung	79
4.2. Östradiolstudie	80
4.2.1. Eintagesbehandlung.....	80
4.2.1.1. Anzahl regulierter Gene.....	81

4.2.1.2. Schnittmengen der Gene nach Eintagesbehandlung mit Östradiol	82
4.2.1.3. Kanonische Signalwege	84
4.2.1.4. Biologische Prozesse	86
4.2.2. Siebentagesbehandlung.....	90
4.2.2.1. Anzahl regulierter Gene	90
4.2.2.2. Schnittmengen	91
4.2.2.3. Kanonische Signalwege	93
4.2.2.4. Biologische Prozesse	95
4.2.3. Effekt der Behandlungsdauer auf die Richtung der Expressionsveränderung	98
4.2.4. Positive oder negative Rückkopplung nach Östradiolgabe	102
4.2.5. Östrogeneffekte auf das Transkriptom des HVC	104
4.2.6. Östrogeneffekte auf die Expression von Neurotransmitterrezeptoren	106
4.2.6.1. Veränderungen des Entwicklungsmusters.....	106
4.2.6.2. Einfluss von Alter und Behandlungsdauer	108
4.2.6.3. Rezeptortyp-spezifische Östradioleffekte.....	110
4.2.7. Östrogeneffekte auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren.....	111
4.2.7.1. Effekte auf Wachstumsfaktoren kanonischer Signalwege mit signifikanten Expressionsänderungen in der Entwicklung	111
4.2.7.2. Effekte auf Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren bei neuronalen Prozessen mit signifikanten Expressionsänderungen in der Entwicklung.....	113
4.2.7.3. Angleichung der Expression von Wachstumsfaktoren durch Östradiol an das Niveau adulter Tiere.....	114
4.2.7.4. Altersunabhängige Stimulation der Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren durch eine siebentägige Östradiolbehandlung.....	115
4.2.8. Hemmung früher östrogener Effekte durch die Behandlung mit Fadrozol	116
4.2.8.1. Gegenläufige Effekte von Östradiol und Fadrozol auf biologische Prozesse.....	117
4.3. Testosteron-Behandlung.....	121
4.3.1. Anzahl der regulierten Gene	121
4.3.2. Schnittmengen	123
4.3.3. Kanonische Signalwege.....	123
4.3.4. Biologische Prozesse	124
4.4. Vergleich androgener und östradioler Effekte	126
4.4.1. Biologische Prozesse basierend auf Östradiol- und Androgen-spezifischer Genregulation.....	128
4.5. Zusammenfassung.....	129

5. Diskussion	131
5.1. Methodendiskussion	131
5.1. Transkriptom-Veränderungen und die Entwicklung des HVC	133
5.2. Hormonelle Effekte auf die Genexpression in der Entwicklung	137
5.2.1. Die Rolle von Östradiol bei der Entwicklung sexualdimorpher Gehirnstrukturen.....	137
5.2.2. Östrogenrezeptoren als Regulationsmechanismen der Genexpression im HVC.....	140
5.2.3. Östrogeninduzierte Mechanismen im HVC vor und zu Beginn der Gesangslernphase	142
5.2.4. Funktionen von Östrogen in der Entwicklung des HVC während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens.....	144
5.3. Zusammenfassung	147
5.3.1. Methode	147
5.3.2. Transkriptome und Entwicklungsphasen.....	148
5.3.3. Funktionen von Östrogen im HVC.....	148
5.3.4. Ausblicke.....	150
6. Abkürzungsverzeichnis	151
7. Literaturverzeichnis	155
8. Danksagung	187
9. Curriculum Vitae	189
10. Erklärung.....	191

1. Zusammenfassung

Singvögel, wie der hier untersuchte Zebrafink, erlernen ihren artspezifischen Gesang während der Juvenilentwicklung in sensiblen Phasen, die erst sensorischer und später sensomotorischer Natur sind. Das neuronale Korrelat für die Fähigkeit Gesang zu erlernen und zu produzieren bildet das Gesangssystem. Es setzt sich aus untereinander verbundenen Neuronenakkumulationen (Gesangskerne) zusammen, und ist sexualdimorph beim adulten männlichen Zebrafinken deutlich prominenter ausgebildet. Ein übergeordneter, für das Erlernen und die Produktion des Gesangs essentieller Gesangskern, ist der HVC (Eigenname). Er empfängt neuronale Innervationen aus auditorischen Gehirnarealen und beeinflusst die Entwicklung und die Funktion nachgeschalteter Gesangskerne. Nach heutigem Wissen exprimiert der HVC als einziger Gesangskern Östrogenrezeptoren. Welchen Einfluss Östrogene auf die Entwicklung des männlichen HVC haben ist allerdings weitgehend unbekannt.

In der hier vorgelegten Arbeit sollten anhand von Untersuchungen des Transkriptoms Hinweise auf zelluläre Veränderungen im HVC männlicher Zebrafinken erarbeitet werden, die während der Juvenilentwicklung auftreten und östrogensensitiv sind. Dafür wurden im ersten Abschnitt der Arbeit die HVC-Transkriptome bei fünf juvenilen Altersstadien analysiert, mit dem Ziel insbesondere Veränderungen der Genexpression im HVC während der Gesangslernphasen zu beschreiben. Für den zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Steroidhormontiter durch systemische Hormongaben (17 β -Östradiol, Testosteron oder Dihydrotestosteron) oder Blockade der Östrogensynthese manipuliert, und die Genexpression im HVC untersucht. In beiden Studien basierte die Bestimmung des HVC-Transkriptoms auf dem für Zebrafinken spezifischen Microarray „*MPIO-ZF1*“. Zur Identifikation zellulärer Prozesse mittels bioinformatischer Analysen wurden die detektierten Gene orthologen Sequenzen des Humangenoms zugeordnet.

Aus der Entwicklungsstudie ging hervor, dass die stärksten Veränderungen in der Genexpression des HVC im Alter zwischen 19 und 25 Tagen zu Tage traten, somit unmittelbar vor dem Beginn der sensorischen Phase des Gesangslernens. Insbesondere konnte zu Beginn der sensorischen Phase eine verstärkte Dynamik der Expression von Genen detektiert werden, welche im Zusammenhang mit Neurogenese und Axonogenese stehen, was mit der Integration neuer zum RA projizierender Neurone in den HVC im Zusammenhang stehen könnte. Veränderungen der Expressionsstärke von Glutamatrezeptoren, wie sie zu Beginn des Gesangslernens im HVC detektiert werden konnten, stehen mit deren Rolle bei der synaptischen Plastizität im Einklang. Ein Alleinstellungsmerkmal des 50 und 100 Tage alten HVC hingegen bildete ein Netzwerk aus Apoptose-relevanten Genen, das im Rahmen der sensomotorischen Gesangslernphase zur Entfernung von Nervenzellen aus dem neuronalen Netzwerk des HVC führen könnte.

Die Reifung des männlichen HVC-Transkriptoms kann zu Beginn des Gesangslernens durch Östradiol gehemmt werden. Mit der Detektion dieses Östrogeneffektes im Gesangssystem gelang erstmals der Nachweis eines molekularen Korrelats für die Annahme, dass Östrogen die Plastizität des juvenilen Gesangs unterstützt. Besonders auffällige Östradioleffekte zu Beginn des Gesangslernens waren Veränderungen bei der Expressionsstärke der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, und damit bei den dadurch beeinflussten zellulären Prozessen, sowie bei der Entwicklung des Kapillarsystems im HVC. Die im weiteren Verlauf der Gesangslernphase unabhängig von der Behandlungsdauer zunehmende Östradiolsensitivität des HVC-Transkriptoms wurde kritisch diskutiert. Weitere in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bilden die Grundlage für eine selektive Analyse der Entwicklung des Gesangssystems und seiner Kontrolle durch Geschlechtshormone auf der Basis von Schlüsselgenen und deren Regulatoren.

Abstract

Songbirds learn their species-specific song in the first weeks post-hatch during a sensitive period which is composed of a sensory and a sensorimotor phase. The neuronal correlate for the ability to produce learned song is formed by the song-system, a network of brain nuclei which is sexually dimorphic and more pronounced in males. One of these song nuclei, the so-called HVC, is located on top of the song system. It receives neuronal projections from several auditory brain areas and affects the development of the consecutive nuclei. Recent studies have shown that HVC is the only nucleus in which estrogen receptors are expressed. However, the influence that estrogens may exert on the development of the male HVC is largely unknown. The aim of the present study was to investigate cellular-level changes in the zebra finch male HVC in relation to ontogeny and estrogen sensitivity, using transcriptome analyses.

In the first part of my thesis, I analyzed the transcriptome of zebra finches at five different stages during the song-learning phase. For the second part, I treated zebra finches at different ages systemically with steroid hormones (17 β -estradiol, testosterone or dihydrotestosterone) or agents blocking estrogen synthesis (Fadrozol). In both studies gene expression in HVC was analyzed using the zebra finch specific microarray "MPIO-ZF1". For an identification of regulated cellular processes, I mapped the sequences to orthologous genes in the human transcriptome, and used GO-terms for further analysis.

The developmental study revealed the strongest differences in gene expression between 19 and 25 day old birds. This time frame corresponds to the transition into the sensory phase of song learning. Especially at the beginning of song learning, several genes related to neurogenesis and axonogenesis showed a very high dynamic of expression, which may be linked with the integration of new HVC to RA projecting neurons. The changes we found in the expression of glutamate receptors which were detectable during that phase are in accordance with findings on their function during the process of synaptic plasticity. The overexpression of several apoptosis-related genes formed a unique characteristic of the 50 and the 100 day old zebra finch which could indicate an active removal of excess-neurons from the song system.

According to the hormone experiments, estradiol may inhibit the maturation of the HVC-transcriptome. These results prove for the first time that estradiol may promote the plasticity of juvenile birdsong. The estrogen treatment modified the expression of NMDA-receptor subunits and affected the development of the endothelium in HVC. I also detected a positive correlation of age with hormone-sensitivity which is discussed in detail. Further results of this thesis provide a first basic step towards a selective molecular analysis of the song system development. Additionally, it gives an insight into the hormonal effects on gene expression and facilitates the analysis of the function of regulatory genes.

2. Einleitung

2.1. Der Zebrafink als Modellorganismus

Bereits ab dem 19. Jahrhundert, lange bevor der Zebrafink (*Taeniopygia guttata*) in wissenschaftlichen Arbeiten untersucht wurde, galt er in Mitteleuropa als gern gehaltenes Haustier. Erst mit Beginn der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelte er sich zu einem Modell für die Untersuchung geschlechtsspezifischen Verhaltens (Morris, 1954; Immelmann, 1962; 1969), was nicht zuletzt auch auf das sexualdimorphe Gefieder zurückzuführen ist. Das Männchen charakterisieren rotbraune Flanken mit weißen, ovalen Punkten, ein schmales schwarzes Brustband, ein rotbrauner Wangenfleck und ein intensiv rot gefärbter Schnabel. Das Weibchen hingegen ist schlichter gefärbt. Die rotbraunen Wangenflecken und Flanken fehlen, wie auch das schwarze Brustband. Der Schnabel ist orange gefärbt. Diesen Gefiederdimorphismus entwickeln Zebrafinken während der ersten Mauser, welche ca. 25 Tagen nach dem Schlupf beginnt (Zann, 1996). Zuvor tragen sie ein einheitlich graues Jugendgefieder und zeigen keinen geschlechtsspezifischen Phänotyp. Neben diesem Sexualdimorphismus unterscheiden sich männliche Tiere grundlegend von Weibchen: Sie sind in der Lage erlernte Gesänge zu produzieren, was auf ein deutlich stärker ausgeprägtes telencephales Netzwerk zurückzuführen ist, welches das neuronale Korrelat für die Gesangsproduktion, das -lernen und die -verarbeitung bildet. Aufgrund dieses Sexualdimorphismus rückte der Zebrafink in den vergangenen sechs Jahrzehnten verstärkt in den Fokus anatomischer, molekularer, endokrinologischer und neurobiologischer Studien (Nottebohm & Arnold, 1976; Gurney & Konishi, 1980; Konishi & Gurney, 1982; Gahr et al., 1987; Gahr, 1990; Gahr & Metzdorf, 1997; Wild, 1997; Dittrich et al., 1999; Agate et al., 2003; Derégnaucourt et al., 2005; Aronov et al., 2008; Derégnaucourt & Gahr, 2013; Frankl et al. 2015).

Der Zebrafink wird zur Familie der Prachtfinken gezählt (*Estrildidae*, Vieillot 1817). Aufgrund seiner Verbreitung werden zwei Rassen unterschieden, deren Vorkommen sich auf semiaride und aride Gebiete in Australien (Rasse: *T.g. castanotis*) und auf den Kleinen Sunda-Inseln (Rasse: *T.g. guttata*) erstrecken (Zann, 1996). Zebrafinken werden als vorwiegend monogam beschrieben (Birkhead et al., 1988; Schielzeth & Bolund, 2010), sie leben und brüten in Kolonien und ernähren sich granivor (Zann, 1996). Ihr Reproduktionszyklus ist nur an die Verfügbarkeit von Ressourcen und nicht an die Jahreszeit gekoppelt („opportunistische Brüter“) (Immelmann, 1962), was ihre Haltung und Zucht unter Laborbedingungen einfach gestaltet. Wie bei vielen Singvogelarten unserer Breiten sind auch beim Zebrafinken beide Geschlechter imstande Gesänge zu memorisieren und entwickeln Präferenzen (Cynx & Nottebohm, 1992;

Lauay et al., 2004). Die Produktion des erlernten Gesangs ist hingegen dem Männchen vorbehalten (Immelmann, 1969).

2.2. Das Zeitalter der „-omics“

*„Ich schlage vor, für den haploiden Chromosomensatz, der im Verein mit dem zugehörigen Protoplasma die materielle Grundlage der systematischen Einheit darstellt den Ausdruck: das **Genom** zu verwenden...“* (Winkler, 1920).

Mit diesen Worten prägte Hans Winkler im Jahre 1920 die Definition des Genoms, das das Erbgut eines Lebewesens oder Virus bildet. Basierend auf dieser Definition entwickelten sich im vergangenen Jahrzehnt unter dem englischen Neologismus die „*genomics*“, die Analyse des Genoms. In den Folgejahren wurden weitere „-omics“ definiert, zahlreiche biologische Arbeitsfelder, welche sich mit der Charakterisierung weiterer biologischer Moleküle beschäftigen (Li, 2013). Das Ziel der Anwendung dieser Technologien ist das Verständnis der Struktur, der Zusammenhänge und der Dynamik dieser biologischen Moleküle in einem Organismus, wobei basierend auf der Analyseebene zahlreiche Disziplinen unterschieden werden. Zu den bekanntesten zählen die „*genomics*“, welche sich mit der Struktur und Funktion der Gene beschäftigt, die „*transcriptomics*“ zur Analyse der Genexpression und schließlich die „*proteomics*“, welche einen Aufschluss über die Gesamtheit aller Proteine liefern.

Die Microarraytechnologie bildet eine der klassischen globalen Analysemethoden in der Disziplin der *transcriptomics*. Diese Technologie wurde im Jahr 1995 begründet, als Schena und Co-Autoren erstmals die Expression von 45 unterschiedlichen mRNA-Sequenzen mit Hilfe eines Glaschips, welcher zu jenen Sequenzen komplementäre Sequenzen trug, analysierten (Schena et al., 1995). Im Laufe der vergangenen 20 Jahre trieben Miniaturisierung und neue bioinformatische Methoden die Entwicklung voran und ermöglichen heute die simultane Analyse ganzer Transkriptome mit mehreren hunderttausend eindeutig adressierbaren Sequenzen. Die größte Limitation dieser Technologie besteht jedoch darin, dass nur bekannte Sequenzen analysiert werden können, die transkriptomweite Analyse mittels Microarrays somit der kompletten Sequenzinformation eines Organismus bedarf. Mit der Publikation des Zebrafinkengenoms im Jahr 2010 wurde dieser für eine transkriptomweite Analyse grundlegende Schritt vollzogen (Warren et al. 2010). Erstmals sind wir in der Lage die globalen molekulargenetischen Vorgänge im Modellorganismus Zebrafink zu analysieren.



Abb. 2.1. Zebrafinchen aus der Brutkolonie am Max-Planck Institut für Ornithologie in Seewiesen. In der Bildmitte ist links das männliche Tier, zu erkennen an den rotbraunen Flanken mit weißen, ovalen Punkten, dem schwarzen Brustband, dem rotbraunen Wangenfleck und dem intensiv rot gefärbter Schnabel; rechts daneben befindet sich das schlichter gefärbte Weibchen, zu erkennen an der deutlich helleren Schnabelfärbung und dem Fehlen der beim männlichen Tier beschriebenen Ornamente.

2.3. Die Gesangsentwicklung des männlichen Zebrafinchen

Die Gruppe der Singvögel (Ordnung: *OSCINES*), das mit ca. 4000 beschriebenen Arten umfangreichste Taxon der Vögel (Gill & Donsker, 2014), hat die Fähigkeit entwickelt Gesang zu erlernen. Der Prozess des Gesanglernens findet in einer sogenannten kritischen Phase statt, welche sich zeitlich je nach Art sehr variabel gestaltet (Thorpe, 1954; Konishi, 1965; Marler, 1970). Beim Zebrafinchen ist dieser Abschnitt zeitlich limitiert und umfasst drei Monate (Arnold, 1975; Zann, 1996; Catchpole & Slater, 2003). Aufgrund dieser begrenzten Lernphase wird er zur Gruppe der „closed-ended-“ oder „age-limited-learner“ gezählt. Andere Arten hingegen, wie der europäische Star (*Sturnus vulgaris*) oder die Nachtigall (*Luscinia megarhynchos*), sind auch als Adulte in der Lage neue Gesänge zu erlernen (Eens, 1997; Absil et al., 2003). Sie werden daher als „open-ended-learner“ bezeichnet. Unabhängig von der Lernstrategie lässt sich die Lernphase funktionell in zwei Zeitfenster unterteilen, welche bei einigen Arten wie der Dachsammer (*Zonotrichia leucophrys*) zeitlich getrennt sind (Thorpe, 1954), bei anderen wie dem Zebrafinchen fließend in einander übergehen (Konishi 1965) (Abb. 2.2). Im Folgenden erläutere ich die Phasen des Gesanglernens.

Im ersten Zeitabschnitt, die als „sensorische Phase“ bezeichnet wird, memorisiert der Jungvogel das Gesangsmuster („template“) eines oder mehrerer männlicher Artgenossen („Tutoren“) (Immelmann, 1969; Slater et al., 1988), wobei weder der Gesang des genetischen,

noch der des sozialen Vaters als Vorbild dienen muss (Derégnaucourt & Gahr, 2013; Poot, 2013). Diese Phase beginnt beim Zebrafinken etwa 25 Tage nach dem Schlupf und dauert zwischen zwei und fünf Wochen (Böhner, 1990; Roper & Zann, 2006). Infolge sozialer Isolation vom Tutor, hierzu erfolgt die Aufzucht nur durch den weiblichen Elter, kann der Beginn der sensorischen Phase hinausgezögert werden, was verdeutlicht, dass die Lernphase einer zeitlichen Variabilität unterliegt (Price, 1979; Jones et al., 1996).

Im Alter von ca. 30 Tagen beginnt der Jungvogel den eigenen Gesang an das memorisierte *template* anzupassen (Arnold, 1975; Nottebohm, 1992; Zann, 1996), was den Beginn der „sensomotorischen Phase“ markiert. In den folgenden Wochen zeichnet sich der Gesang durch eine starke Plastizität aus und wird daher als „*subsong*“ bezeichnet. Beginnend mit dieser Phase passt der Vogel seine motorischen und neuronalen Fähigkeiten zu singen mehr und mehr an das zuvor erlernte *template* an. Als essentieller Faktor für diesen Prozess hat sich auditorische Rückkopplung erwiesen, welche auch für die Aufrechterhaltung der Stabilität des späteren Adultgesangs unabdingbar ist (Konishi, 1965; Leonardo & Konishi, 1999; Brainard & Doupe, 2000). Im Alter von ca. 100 Tagen ist das Gesangslernen weitgehend abgeschlossen (Zann, 1996). Fortan produziert der Zebrafink ein sehr stereotypes Gesangsmuster, welches sein Leben lang weitestgehend konstant sein wird (Immelmann, 1969). Weitere Untersuchungen zeigten im Detail, dass zwischen dem vierten und 15. Monat nach dem Schlupf weitere geringfügige Veränderungen des Gesanges stattfinden (Pytte et al., 2007; McDonald & Kirn, 2012).

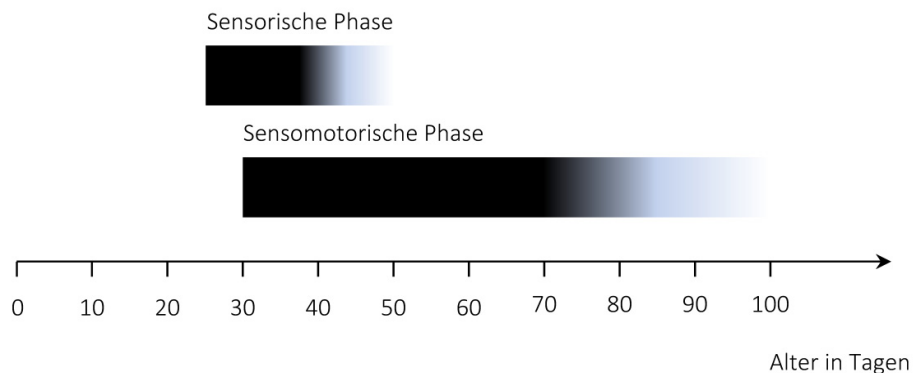


Abb. 2.2. Zeitlicher Verlauf des Gesangslernens von Zebrafinken. In der sensorischen Phase erlernen juvenile Vögel den Tutorgesang. Diese findet zwischen dem 25. und 60. Tag statt und überschneidet sich beim Männchen mit der sensomotorischen Phase, welche mit der Kristallisation nach ca. 100 Tagen endet.

2.4. Das neuronale Korrelat für den Gesang: Das Gesangssystem

Der Vogelgesang basiert auf einer komplexen physiologischen Leistung. Diese setzt die zeitlich exakt aufeinander abgestimmte Steuerung der Atmungs- und der Syrinxmuskulatur voraus (Suthers et al., 1999; Elemans et al., 2008; Andelman et al., 2011). Obgleich alle Vogelarten in der Lage sind einfache Rufe zu produzieren, haben neben den Singvögeln nur Papageien (Ordnung: *Psittaciformes*) und Kolibris (Ordnung: *Trochiliformes*) ein adäquates neuronales System und die Fähigkeit Gesang zu erlernen entwickelt (Nottebohm et al., 1976; Gahr, 2000; Jarvis et al., 2000). Ob es sich hierbei um konvergente oder divergente Entwicklungen handelt, ist nicht hinreichend geklärt (Hackett et al., 2008; Suh et al., 2011; Jarvis et al., 2014)

Das neuronale Korrelat für das Erlernen und die Produktion des Gesangs bildet bei den Singvögeln ein Netzwerk aus zumeist im Telencephalon gelegenen Akkumulationen von Neuronen (Nottebohm & Arnold, 1976; Striedter, 1994; Vu et al., 1994; Vates et al., 1997; Wild, 1997). Dieses Netzwerk unterscheidet sich elektrophysiologisch, molekulargenetisch und anatomisch vom umgebenden Parenchym (Nottebohm et al., 1976; Margoliash, 1997; Wild, 1997) und wird als Gesangssystem beschrieben (McCasland, 1987). Aufgrund zahlreicher funktioneller und entwicklungsbiologischer Ähnlichkeiten ist dieses Netzwerk mit Gebieten des Neocortex der Säuger vergleichbar (Reiner et al., 2004), besteht allerdings im Gegensatz zum Säuger, dessen Cortex laminar organisiert ist, aus sphärischen Strukturen. Diese werden als Gesangskerne beschrieben und sind durch Projektionsneurone untereinander verschaltet (Nottebohm et al., 1982; Fortune and Margoliash 1995).

2.4.1. Die Neuroanatomie des Gesangssystems

Aufgrund des Verschaltungsmusters und funktioneller Unterschiede lässt sich das Gesangssystem in zwei Kompartimente unterteilen, wobei die caudal gelegene „Prämotorische Bahn“ (PMB) die neuronale Grundlage für die Produktion des Adultgesangs, die „Anteriore Vorderhirnschleife“ (AVS) jene für das Gesangslernen bildet (Nottebohm et al., 1982; Bottjer et al., 1984; Scharff et al., 1998; Andelman & Fee, 2009).

Am apikalen Ende beider Kompartimente sitzt der Gesangskern HVC (eigenständiger Name, früher „*high Vocal Center*“; Reiner et al. 2004). Seine Funktion besteht in der zeitlichen Steuerung der Silbenabfolge (Hahnloser et al., 2002). Der HVC erhält auditorischen Input aus zahlreichen Gehirnnarealen. Hierzu zählen das primäre auditorische Areal FeldL2 (Kelley & Nottebohm, 1979; Shaevitz & Theunissen, 2007), das als Äquivalent zum „*layer 4*“ des primären auditorischen Cortex A1 der Säugetiere gilt (Wang et al., 2010; Butler et al., 2011), die Bereiche NCM („*Nidopallium caudomediale*“), UVA („*Nucleus uvaeformis*“) und AVT („*Area ventralis of Tsai*“) (Wild, 1994; Foster et al., 1997; Foster & Bottjer, 1998; Appeltants et al., 2001; Appeltants et al., 2002; Lynch et al., 2013), sowie Nif („*Nucleus interfascialis nidopallii*“), ein Bereich der

direkt an FeldL2 angrenzt, der sowohl direkt (Nottebohm et al., 1982) als auch indirekt, via AV („Nucleus avalanche“), mit dem HVC verbunden ist (Akutagawa and Konishi 2010). Da die Aktivität in Nif jener im HVC um 20 Millisekunden vorausgeht und diese stark korrelieren, gilt Nif als Quelle der exzitatorischen Aktivität im HVC (Cardin & Schmidt, 2004; Coleman & Mooney, 2004).

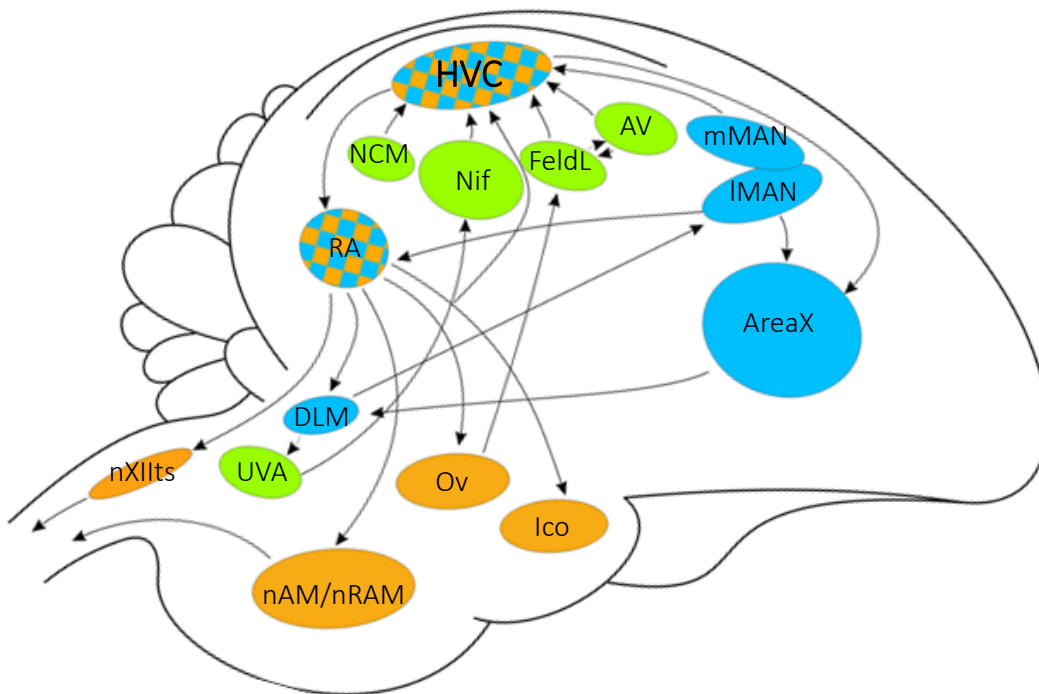


Abb. 2.3. Schematische Darstellung des Gesangssystems des adulten männlichen Zebrafinken. Aus Übersichtsgründen wurden nur die am häufigsten genannten Nuklei und Verbindungen eingezeichnet. (blau/gelb= Prämotorische Bahn, blau = Anteriore Vorderhirnschleife, grün = neuronaler Input in HVC. Die Abkürzungen der Kerne lauten wie folgt: AreaX = Area X striatalis medialis, AV = Nucleus avalanche, DLM = Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus, FeldL = FeldL, HVC = HVC, Ico = Nucleus intercollicularis, IMAN = Nucleus lateralis magnocellularis nidopalii anterioris, mMAN = Nucleus medialis magnocellularis nidopalii anterioris, nAM = Nucleus ambiguus, nRAM = Nucleus retroambiguus, Nif = Nucleus interfascialis nidopalii, NCM = Nidopallium caudomediale, nXIIIts = Nucleus hypoglossus, Ov = Nucleus ovoidalis, RA = Nucleus robustus arcopallii, UVA = Nucleus uvulaeformis). Abbildung nach (Reiner et al., 2004).

2.4.1.1. Die Prämotorischen Bahn (PMB)

Eine Population projizierender Neurone im HVC sendet Axone in den Nukleus RA („Nucleus robustus arcopallii“) (Yip et al., 2012). RA bildet als prämotorischer Kern das basale Ende des Gesangssystems im Telencephalon. Die direkte Verbindung zwischen HVC und RA wird

zu Beginn der Gesangslernphase im Alter von 25-30 Tagen nach dem Schlupf geschlossen (Mooney & Rao, 1994) und ist essentiell sowohl für das Gesangslernen (Akutagawa & Konishi, 1994), als auch für die Produktion des erlernten Adultgesang (McCasland & Konishi, 1981; Simpson & Vicario, 1990). Zeitlebens werden neue Projektionsneurone gebildet, wobei sie bei saisonalen Vogelarten abgestorbene Neurone ersetzen. Beim opportunistisch brütenden Zebrafink hingegen werden sie stets zu den bereits existierenden hinzugefügt und nicht ersetzt (Alvarez-Buylla et al., 1990; Walton et al., 2012). Vom RA existieren afferente Projektionen in den dorsomedialen Bereich des im Mesencephalon gelegenen Kern Ico („*Nucleus intercollicularis*“). Zudem projizieren Axone in die metencephalen Kerne nAM („*Nucleus ambiguus*“) und nRAM („*Nucleus retroambiguus*“), welche über Motorneurone die Respiration steuern (Wild, 1993b; Spiro et al., 1999). Darüber hinaus innervieren Neurone aus RA den Kern nXIIits („*Nucleus hypoglossus*“), welcher über den zwölften Cranialnerv das stimmgebende Organ, die Syrinx, ansteuert (Vicario, 1991; Wild, 1993a).

2.4.1.2. Die Anteriore Vorderhirnschleife (AVS)

Eine weitere, wenn auch indirekt afferente Verbindung von HVC zu RA wird durch die „Anteriore Vorderhirnschleife“ (AVS) gebildet (Abb. 2.3). Die AVS bildet das neuronale Korrelat für das Gesangslernen. Sie beginnt mit dem HVC und setzt sich aus den folgenden, nachgeschalteten Kernen zusammen: der AreaX („*Area X striatalis medialis*“), dem thalamischen Nukleus DLM („*Nucleus dorsolateralis medialis*“) und dem im Nidopallium gelegenen Kernen IMAN („*Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris*“) und mMAN („*Nucleus medialis magnocellularis nidopallii anterioris*“) (Farries, 2004; Yip et al., 2012). Axone aus IMAN bilden eine Bifurkation, wobei ein Neuronenbündel wiederum die AreaX (Vates & Nottebohm, 1995) und ein anderes den RA innerviert (Johnson et al., 1995; Perkel & Farries, 2000; Luo et al., 2001; Person et al., 2008). Bilaterale Läsionsstudien bei juvenilen Zebrafinken zeigen, dass IMAN, DLM und AreaX das Gesangslernen und die Gesangsproduktion qualitativ unterschiedlich beeinflussen (Bottjer et al., 1984; Sohrabji et al., 1990; Scharff & Nottebohm, 1991; Scharff et al., 1998; Kittelberger & Mooney, 1999; Bottjer & Altenau, 2010; Chen et al., 2014). Bei adulten Zebrafinken wirken sich bilaterale Läsionen des IMAN wohl nicht destabilisierend auf die Gesangsstruktur aus (Nordeen & Nordeen, 1993), während Läsionen der AreaX bei Japanischen Möwchen (*Lonchura striata*) substantielle Defizite in der Gesangsproduktion nach sich ziehen (Kobayashi et al., 2001). Jedoch ist die AVS auch beim Gesang adulter Zebrafinken beteiligt, da sich unterschiedlicher sozialer Kontext auf die neuronale Aktivität in IMAN und AreaX während des Singens auswirkt, was auf spezifischen neuronalen Input AreaX-projezierender Neurone aus HVC zurückzuführen ist (Jarvis, 1997; Hessler & Doupe, 1999). Diese Aktivität zeigen RA-Projektionen aus HVC nicht (Katz & Gurney, 1981). Darüber hinaus erhält RA neuronalen Input aus IMAN, welcher der Aufrechterhaltung des kristallisierten Gesangs in Form auditorischer Rückkopplung dient (Leonardo, 2004, aber: Nordeen & Nordeen, 1993).

2.5. Die Funktionalität des HVC

Obgleich zahlreiche Schnittpunkte existieren, bildet der HVC den essentiellen Schnittpunkt für das neuronale Netzwerk, welches das Gesangslernen und die Gesangsproduktion steuert. Dies verdeutlichen zahlreiche Läsionsstudien. Wird der HVC bei adulten Tieren biochemisch oder anatomisch zerstört, sind sie nicht mehr in der Lage kristallisierten Gesang zu produzieren (Nottebohm et al., 1976; Hahnloser et al., 2002; Thompson & Johnson, 2007). Variabler *subsong*, welcher weitestgehend dem Gesang juveniler Tiere entspricht, kann hingegen weiterhin geäußert werden (Aronov et al., 2008). Vergleichbare Eingriffe in das Gesangssystem juveniler Tiere beeinträchtigten die Lernfähigkeit grundlegend (Aronov et al., 2008). Mikroläsionen im HVC adulter Zebrafinken wirken sich hingegen nur kurzfristig destabilisierend auf die Gesangsstruktur aus, wobei der Regenerationsprozess auditorische Rückkopplung benötigt (Thompson & Johnson, 2007). Der Nachweis spezifischer Neurone (Spiegelneurone), deren Aktivitätsmuster bei der Produktion von Silben exakt jenem entspricht, das auch durch die Wahrnehmung dieser Silben ausgelöst wird, verweist zudem auf eine kognitive Rolle des HVC (Prather et al., 2008). Weitere Studien zeigen, dass die Läsion des HVCs bei weiblichen Kanarienvögeln und Zebrafinken ein vormals gezeigtes Präferenzmuster für spezifische Gesänge und Gesangsparameter auslöscht, was eine wichtige Funktion für die Gesangswahrnehmung bestätigt (Del Negro et al., 1998; MacDougall-Shackleton et al., 1998).

2.6. Das Gesangssystem und die Rolle von Östradiol

2.6.1. Der Sexualdimorphismus

Der Gesang beim Zebrafinken ist ein klassisches Beispiel sexualdimorphen Verhaltens. In zahlreichen Singvogelarten ist nur das Männchen in der Lage erlernten Gesang zu produzieren (für Übersichtsartikel siehe: Odom et al., 2014). Dieser Sexualdimorphismus definiert sich auf neuronaler Basis durch die geschlechtsspezifische Entwicklung des Gesangssystems, was auf verschiedenen molekularen und anatomischen Ebenen sichtbar wird. Die Größe der Gesangskerne ist unterschiedlich (Nottebohm & Arnold, 1976; Konishi & Akutagawa, 1987; Konishi & Akutagawa, 1990; Adret & Margoliash, 2002; Wade & Arnold, 2004), was sich beim HVC in der frühen postembryonalen Entwicklung etabliert (Nixdorf-Bergweiler, 1996; Gahr & Metzdorf, 1999): Bis zum Alter von zehn Tagen unterscheiden sich der HVC männlicher und weiblicher Tiere bezüglich der Neuronenanzahl und des Volumens (Nissl-Färbung) nicht (Kirn & DeVoogd, 1989; Nixdorf-Bergweiler, 1996), wobei jedoch Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Größe gemessen an den Androgenrezeptor-exprimierenden Zellen festzustellen sind (Gahr & Metzdorf, 1999). Beim männlichen Vogel wächst der HVC anschließend linear mit dem Telencephalon bis zum 20. Tag. Danach erfährt er eine stärkere Zunahme als das umgebende

Gewebe und erreicht um den 60. Tag das adulte Volumen (Bottjer et al., 1985; Nixdorf-Bergweiler, 1996). Beim weiblichen Zebrafinken hingegen schrumpft der HVC zwischen dem zehnten und 40. Tag, was auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist (Kirn & DeVoogd, 1989) und erreicht beim adulten Weibchen nur ca. 16% des männlichen Volumens (Nixdorf-Bergweiler, 1996; Gahr & Metzdorf, 1999). Desweiteren sind die Verschaltung zwischen den Kernregionen beim Männchen deutlich prominenter ausgebildet als beim Weibchen (Nordeen et al., 1987; Nordeen & Nordeen, 1989; Mooney & Rao, 1994). Schließlich findet sich der Sexualdimorphismus auch in der Größe der Neuronensomata, der Anzahl der Dendriten und der Dichte der Synapsen in den Gesangskernen wieder (DeVoogd & Nottebohm, 1981; Nealen, 2005).

2.6.2. Genetische Basis des Sexualdimorphismus

Ursächlich für die primäre sexualdimorphe Gehirnentwicklung sind entgegen früherer Annahmen nicht hormonelle Einflüsse gonadalen Ursprungs (Adkins & Adler, 1972). Das Geschlecht des optisch monomorphen Gehirns wird beim Vogel, wie auch beim Säuger, ultimat durch genetische Faktoren determiniert (Carrer & Cambiasso, 2002; Agate et al., 2003; 2004; Gahr, 2003; Wade et al., 2005), was zur Aktivierung spezifischer Gene führt. Die im Zuge dessen exprimierten Geschlechtshormonrezeptoren modifizieren nach Aktivierung durch Liganden direkt als Transkriptionsfaktoren oder indirekt über weitere Genkaskaden die Transkription und steuern somit die Entwicklung. Das Gesangssystem bildet eines dieser Zielorgane hormoneller Wirkung (Balthazart et al., 1992; Gahr et al., 1993; Jacobs et al., 1996). So werden Androgenrezeptoren (AR) im telencephalen Gesangssystem in IMAN, AreaX, RA und HVC exprimiert (Metzdorf et al., 1999; Gahr, 2000). Die Expression östradiolsensitiver Rezeptoren ist beim Zebrafinken auf den caudomedialen HVC und einen Bereich dorsal von RA begrenzt („*RA-cup*“), wobei sich dieser Geschlechtsdimorphismus lediglich auf quantitativer Ebene darstellt (Gahr et al., 1987; Gahr & Konishi, 1988; Gahr & Metzdorf, 1997; 1999; Metzdorf et al., 1999; Gahr, 2004; Kim et al., 2004; Peterson et al., 2005). Aus funktioneller Sicht hervorzuheben ist, dass ARs in HVC-Neuronen detektiert werden konnten, welche in die Kerne AreaX und RA projizieren. Östrogenrezeptoren konnten hingegen nur in solchen Neuronen nachgewiesen werden, welche mit AreaX in direkter Verbindung stehen (Nordeen et al., 1987; Gahr, 1990; Bottjer & Johnson, 1997). Dieser Unterschied deutet auf unterschiedliche Funktionen der beiden Steroidhormone im HVC hin. Während Östrogene vermutlich eher die frühe Gesangslernphase beeinflussen, induzieren Androgene eher Effekte, welche die Gesangsproduktion umfassen.

2.6.3. Die Rolle von Östrogen für Sexualdimorphismus

Wie Studien zur Entwicklung sexualdimorpher Hirnareale beim Säuger nahelegen (Gorski et al. 1980; Döhler et al. 1984; Baum et al. 1990; für Übersichtsartikel siehe: Sakuma 2009), könnten Östrogene auch für die Ausprägung des Sexualdimorphismus beim Zebrafinken eine essentielle Rolle spielen. Allgemein spielen Östrogene eine Schlüsselrolle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der weiblichen Sexualfunktionen. Zudem steuern sie geschlechtsunabhängig pleiotropische Effekte, indem sie beispielsweise die Zellproliferation und Mitose regulieren. Sie nehmen Einfluss auf zahlreiche biologische Prozesse im kardiovaskulären System, in der Osteogenese, im Immunsystem, im zentralen Nervensystem, wirken neuroprotektiv und spielen für die Reparatur geschädigter Gehirnareale, z.B. infolge eines Schlaganfalls, eine essentielle Rolle (Hughes & Boyce, 1998; Wilson et al., 2006; Schwarz & McCarthy, 2008).

Einen deutlichen Hinweis für östrogene Effekte auf die geschlechtsspezifische Entwicklung beim Zebrafinken liefert eine Studie aus dem Jahr 1980 (Gurney & Konishi, 1980): Werden weibliche Zebrafinken kurz nach dem Schlupf mit 17 β -Östradiol behandelt, so entwickelt ein Teil der Tiere ein dem Männchen ähnliches Gesangssystem, was sämtliche Kerne umfasst. (Gurney & Konishi, 1980; Gurney, 1982; Grisham & Arnold, 1995; Jacobs et al., 1995). Die Tatsache, dass nicht alle Tiere in gleicher Weise maskulinisierbar sind, deutet jedoch auch auf weitere Faktoren hin, die den Entwicklungsprozess beeinflussen könnten. Es ist zudem anzumerken, dass der HVC in Kanarienvögel bereits sexualdimorph ist, bevor Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden konnten (Gahr, 1996; Gahr et al., 1996).

Da nach heutigem Wissen der HVC als einziger Gesangskern östrogensensitive Rezeptoren exprimiert, gilt er als Wirkort östrogenen Effekte auf den Gesang. Wie Läsionsstudien belegen, ist die Maskulinisierung der nachgeschalteten Kerne RA und AreaX auf östrogene Effekte im HVC zurückzuführen (Herrmann & Arnold, 1991; Akutagawa & Konishi, 1994). Östrogene bewirken zudem, wie *in vitro* Studien belegen, ein für weibliche Tiere atypisches verstärktes Einwandern von Axonen aus HVC in RA (Konishi & Akutagawa, 1985; Holloway & Clayton, 2001). Allerdings können durch die Blockade östrogenen Effekte nur einige Aspekte der nativen männlichen Entwicklung verhindert werden (Dittrich et al., 1999; Holloway & Clayton, 2001; Kim et al., 2004). Versuche die gesamte Entwicklung des männlichen Gesangssystems durch Inhibierung der Östrogensynthese, speziell des Enzyms Aromatase, das Testosteron in Östradiol umwandelt, oder durch Blockade von Hormonrezeptoren zu verhindern, schlugen fehl (Wade & Arnold, 1994; Merten & Stocker-Buschina, 1995). Paradoxerweise führten sie teilweise sogar zu einer Hypermaskulinisierung (Mathews et al., 1988; Mathews & Arnold, 1990).

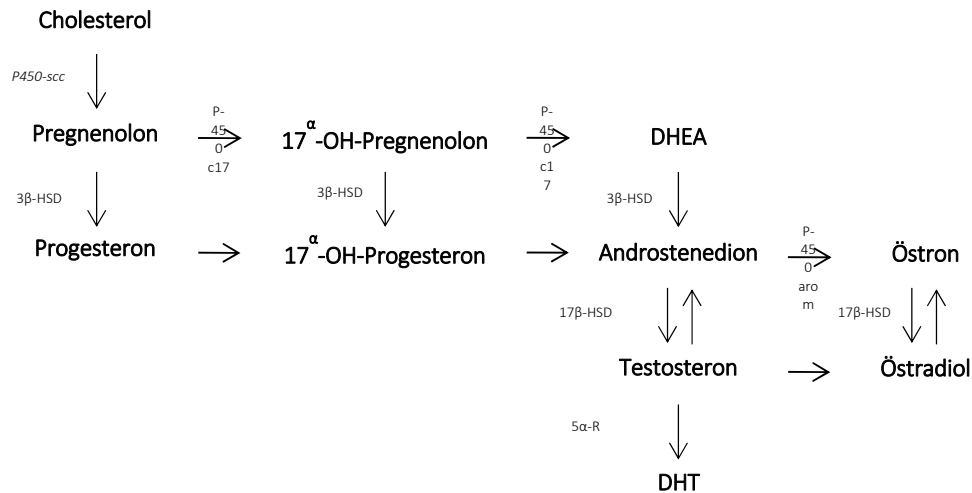


Abb. 2.4. Östradiolsyntheseweg basierend auf dem Sterol Cholesterol. (3β-HSD = 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 5α-R = Steroid-5α-Reduktase 1, 17β-HSD = 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, DHEA = Dehydroepiandrosteron, DHT = Dihydrotestosteron, P450arom = Aromatase (CYP19A1), P450c17 = Steroid-17α-Hydroxylase (CYP17))

2.6.4. Wo wird neuronal aktives Östradiol gebildet

Die Steroidgruppe der Östrogene umfasst neben Östron und Östriol, das neurophysiologisch aktivste Derivat, 17β-Östradiol, fortan als Östradiol bezeichnet. Wie alle Vertreter der Stoffklasse der Steroidhormone, werden sie auf Basis von Cholesterol synthetisiert (Abb.2.4) und können aufgrund ihrer lipophilen Struktur frei durch Membranen diffundieren. Im weiblichen Organismus wird Östradiol primär in den Granulosazellen des Ovars, im männlichen Organismus in den Hoden gebildet. Zusätzlich findet in der Nebennierenrinde Sexualhormonproduktion statt. Der Befund, dass östrogene Effekte direkt oder indirekt Entwicklungsunterschiede induzieren, wirft die Frage auf, wo das nötige Östrogen im männlichen Tier synthetisiert wird. Zum einen konnten bislang keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Frage nach signifikanten Unterschieden des Bluttiters in juvenilen Männchen und Weibchen detektiert werden (Hutchison et al., 1984; Adkins-Regan et al., 1990; Schlinger & Arnold, 1992). Zum anderen führt eine Erhöhung des Östrogenbluttiters durch die Gabe von 17β-Östradiol zur Feminisierung der Syrinx, was die Gesangsproduktion negativ beeinflusst (Wade et al., 2002) und nahelegt, dass der HVC autokrin Steroidhormone erhält. Eine Studie an Zebrafinken belegt, dass die Fähigkeit zu singen durch frühe Kastration nicht beeinträchtigt wurde (Adkins-Regan & Ascenzi, 1990), wobei die Gonadektomie zur deutlichen Erhöhung des Östradioltiters im Blut beider Geschlechter führt (Adkins-Regan et al., 1990). Dies impliziert, dass neben den genannten Organen weitere Gewebe existieren müssen, welche in der Lage sind Steroidhormone zu synthetisieren. Neben peripheren Geweben gilt seit geraumer Zeit auch das Gehirn als Ort für die Steroidhormonsynthese (Baulieu et al., 2001). Inzwischen belegen zahlreiche Studien, dass

auch das Singvogelhirn in der Lage ist, Steroide *de novo* zu synthetisieren (für Übersichtsartikel siehe: Schlinger, 1994; Schlinger & Remage-Healey, 2012). Sämtliche notwendigen Enzyme für die Östrogensynthese, im speziellen Aromatase, konnten im Telencephalon nachgewiesen werden (London et al., 2006; London et al., 2009; London & Clayton, 2010; Remage-Healey et al., 2010; Schlinger et al., 2014). Inwieweit das Gesangssystem im Hinblick auf die Steroidsynthese vollkommen autark von den Gonaden oder der Nebenniere sein könnte, ist unbekannt (Schlinger, 1994). Studien an Ratten belegen, dass der Hippocampus, auch dieses Gewebe verfügt über alle notwendigen Enzyme zur *de novo* Steroidsynthese, Hormonkonzentrationen aufweist, welche deutlich über dem Bluttitel liegen (Mukai et al., 2006; Hojo et al., 2009)

2.7. Der Östrogenrezeptor im Gesangssystem

Der Östrogenrezeptor stellt die ursprünglichste Form aller Steroidhormonrezeptoren bei den Vertebraten dar und entwickelte sich, wie DNA-Rekonstruktionen nahelegen, vor ca. 450 Mio Jahren (Escriva et al., 1997; Baker, 2003). War der erste Östrogenrezeptor, heute als Östrogenrezeptor α beschrieben (*ESR1*, *ER- α*) im Jahre 1962 bei Ratten entdeckt worden, führten weitere Arbeiten von Kuiper und Mitarbeitern (Kuiper et al., 1996) an Rattenovarien zur Entdeckung eines zweiten östrogensensitiven Kernrezeptors (Östrogenrezeptor β , *ESR2*, *ER- β*). Beide Rezeptoren unterscheiden sich beim Menschen nur in sehr geringem Umfang hinsichtlich der Bindungsdomänen (Hall & McDonnell, 1999; Pettersson et al., 2000). Obgleich sie beim Säuger teilweise in gleichen Geweben und Strukturen ausgeprägt werden (Gao & Dahlman-Wright, 2011), handelt es sich bei beiden Subtypen um funktionell unabhängige Einheiten, welche sich zudem hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten unterscheiden (Vanacker, 1999). Sie werden von unterschiedlichen Genen codiert, die auf unterschiedlichen Chromosomen im Genom lokalisiert sind. Beim Zebrafinken befindet sich *ER- α* auf Chromosom drei und erstreckt sich von Base 56.300.104 bis 56.405.816 auf dem reversen Strang. Bislang ist nur eine Transkriptvariante (Transkript: 2652 Basen, acht Exone) bekannt, welche aus 589 Aminosäuren besteht. *ER- β* hingegen wird auf Chromosom zwei codiert und reicht von Base 54.916.211 bis 54.944.478. Auch hier ist ein Transkript bekannt (Transkript: 1665 Basen, acht Exone) bestehend aus 554 Aminosäuren.

Generell werden die beiden Östrogenrezeptoren *ER- α* und *ER- β* unterschiedlich im Gehirn von Singvögeln exprimiert. Während *ER- α* im Gesangssystem von Zebrafinken und weiteren Arten entdeckt worden ist, gibt es bislang keinerlei Nachweise für die Expression von *ER- β* im Gesangssystem (Gahr, 1988; Gahr & Konishi, 1988; Jacobs et al., 1996; Bernard et al., 1999).

Die Expressionsstärke des *ER- α* im HVC verläuft entwicklungsabhängig und zeigt beim Männchen ein Maximum zwischen dem 40-ten und dem 60-ten Tag (Gahr & Konishi, 1988). Bei weiblichen Tieren ist bereits nach 40 Tagen eine deutliche Reduktion der Anzahl der östrogensensitiven Zellen zu verzeichnen (Gahr, 1988). Dies entspricht der altersabhängigen

Limitierung, in der weibliche Tiere durch Östradiolgabe maskulinisiert werden können (Konishi & Akutagawa, 1987), und legt daher die Vermutung nahe, dass die entwicklungsabhängige Östrogenrezeptorexpression mit dem Beginn der Gesangslernphase in Zusammenhang stehen könnte. Einen deutlichen Hinweis hierauf gibt die östrogenabhängige Aktivierung des neurotrophen Faktors „*Brain derived neurotrophic factor*“ (*BDNF*) im HVC (Dittrich et al., 1999). *BDNF* ist in zahlreichen neuronalen Systemen beim Säuger bei der Gedächtnisbildung und in Lernprozessen maßgeblich involviert (für Übersichtsartikel siehe: Scharfman & MacLusky, 2006; Cunha et al., 2010) und wird mit Beginn der sensorischen Phase des Zebrafinken im HVC aktiviert (Dittrich et al., 1999). Auch beim Singvogelmodell wirkt sich *BDNF* auf die Lernfähigkeit aus. Nach *in vivo* Transfektion mit *BDNF* verzeichnen juvenile Zebrafinken eine erhöhte Kopiergenauigkeit, verbessert das sensorische lernen jedoch nicht (Dittrich et al., 2013).

2.8. Der Microarray

Wie bereits eingangs erwähnt, bildet die Entwicklung des Microarrays die Möglichkeit das gesamte, soweit bekannte Transkriptom eines Organismus zeitgleich zu analysieren. Der Begriff des „Microarray“ basiert zum einen auf der Halbleiter- und Microsystemtechnik, in der bereits vor Jahrzehnten der Begriff des „Microchips“ geprägt wurde und der symbolisch für eine Miniaturisierung von Datenmengen und Verarbeitungsprozessen steht. Zum anderen beschreibt ein „Array“ eine Datenstruktur, wie zum Beispiel die Anordnung von Messeinheiten. Die Microarraytechnik verbindet beide Entwicklungen, indem sie auf äußerst limitiertem Raum die simultane, eindeutig adressierbare Analyse tausender Einzelnachweise ermöglicht. Obgleich in den letzten Jahren aufgrund zahlreicher spezieller Anforderungen und Weiterentwicklungen Subtypen des klassischen Arrays entstanden sind (z.B. tiling array, exon array, ChIP-on-chip), entspricht die Vorgehensweise für die Transkriptomanalyse noch immer dem Grundprinzip:

Einzelsträngige Sequenzen, entweder maschinell erzeugt oder in Bakterienkulturen vervielfältigt, werden auf klar definierten Koordinaten und in hoher Dichte auf einem Träger, einer Glas - oder Plastikoberfläche, verankert. Dort dienen sie als Fängersequenzen für komplementäre Sequenzen. Auf diese Oberfläche wird in einem Hybridisierungsschritt die zuvor mehrfach prozessierte zu analysierende Probe mit unbekannten Nukleinsäuresequenzen gebracht, welchen zuvor ein fluoreszierendes Chromofor (z.B. Cy3, Cy5, Biotin) angeheftet wurde. Die Sequenzen aus der Probe binden mittels Wasserstoffbrückenbindungen in einem Hybridisierungsschritt an den Fängersequenzen. Ungebundene und nicht-spezifisch gebundene Probensequenzen werden abgewaschen. Anschließend wird der Microarray mit einem Laser einer klar definierten Wellenlänge abgetastet, so dass das an Sonden gebundene Chromofor Licht emittiert, wobei dessen Intensität mit der Menge an gebundener Sequenz korreliert. Die Lichtintensität wird mit Hilfe eines Scanners gemessen, in ein digitales Signal übersetzt und weiterverarbeitet.

Im Laufe der vergangenen drei Jahrzehnte wurden im Bereich der Microarraytechnologie zur klassischen Transkriptomanalyse zwei Entwicklungsrichtungen vorangetrieben, die sich in mehrerer Hinsicht unterscheiden.

Der ursprüngliche Arraytyp („cDNA Array“) basiert auf der Verwendung relativ großer Fängersequenzen, welche aus 500 bis 5000 Basen bestehen. Aufgrund der langen Fängersequenzen zeichnen sich diese cDNA-Arrays durch eine hohe Sensitivität aus. Allerdings nimmt man damit auch eine hohe Anzahl von Fehlhybridisierungen in Kauf, was zu einer verringerten Spezifität führen kann. Dies wird vor allem dann zu einem Problem, wenn die zu analysierenden Sequenzen eine starke Ähnlichkeit aufweisen, wie es bei Mitgliedern einer Genfamilie der Fall sein kann.

Affymetrix verfolgt mit dem „Oligonukleotid-Array“ einen anderen Ansatz. Hierbei werden im Gegensatz zum cDNA-Array-Typ sehr kurze Fängersequenzen („Sonden“) verwendet. Diese Sonden bestehen aus 25 Basen, welche in der Regel mehrfach auf einem Microarray in sehr hoher Dichte aufgetragen werden. Affymetrix fasst mehrere dieser Sonden als Sondenstet zusammen, die eine Nukleotidabfolge repräsentieren, wobei es sich um eine Transkriptvariante oder nur einen Abschnitt eines Transkripts handeln kann. Die für diese Arbeit verwendete Software greift auf die Rohdaten, sprich die Sonden zurück. Wie sich dies begründet und was es für die Auswertung bedeutet, werde ich im späteren Verlauf darlegen (siehe Material und Methoden, Abb. 3.7). Die Produktion der Sonden erfolgt mittels photolithographischer Festphasensynthese, auch „*very large scale immobilized polymer synthesis*“ (VLSIPS) genannt, wobei Nukleotid für Nukleotid auf dem Chip aufgebaut wird. Hierzu werden durch Lichtbestrahlung, welches durch eine photolithographische Maske fällt, photosensitive Schutzgruppen auf einem Träger aktiviert. Im zweiten Schritt wird der Träger mit einer wiederum photosensitiven Base überschwemmt, wobei die Base an der zuvor beleuchteten Stelle bindet. Problematisch ist bei dieser Methode, dass die Effizienz, mit welcher neue Nukleotide gebunden werden, bei ca. 98% liegt. Hieraus resultiert eine deutliche Limitation der Sondenlänge, womit bei Sequenzen bestehend aus 25 Nukleotiden eine Ungenauigkeit von annähernd 60% erreicht wird.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden Pilotstudien durchgeführt, wobei das erhaltene Material anhand von cDNA-Arrays analysiert wurde. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Ergebnisse nicht annähernd zufriedenstellend waren. Dieser Umstand beruhte zum einen auf der Qualität der Microarrays und der Tatsache, dass nur ein kleiner Bereich des Transkriptoms auf den Chips abgebildet worden ist. Aus diesen Gründen wurde in den ersten drei Jahren meiner Doktorarbeit in Kooperation mit Affymetrix ein „custom-Array“ entwickelt, dessen Datengrundlage auf der im Jahr 2010 verfügbaren Sequenzinformation für das Zebrafinkentranskriptom beruhte und durch zwei Sequenzierungsansätze erweitert wurde. Der schließlich entwickelte Microarray namens **MPIO-ZF1** enthält 232688 Sondenstets, welchen 31946 mRNA-Sequenzen zugeordnet werden können.

Eine Problematik zahlreicher Transkriptomanalysen, wie auch in der vorliegenden Studie, besteht in der geringen Menge an extrahierbarer mRNA. Dies macht eine Amplifikation der mRNA unumgänglich und limitierte lange Jahre die Analyse von Genexpressionsprofilen, da für

die Amplifikation zumeist das gängige Eberwine-Protokoll (3' *in vitro* Transcription (3'IVT)) Anwendung fand (Eberwine et al., 1992). Hierbei werden die zum amplifizierenden mRNA-Sequenzen anhand des für die Stabilität, die Prozessierung und den Transport wichtige Poly-Adenosin-Schwanzes am 3'-Ende erkannt und mittels T7 oligo(dt) Primer amplifiziert. Problematisch ist diese Methode der Amplifikation aus mehreren Gründen. Zum einen werden lediglich Bereiche vervielfältigt, die sehr nahe am 3'-Ende eines Genes liegen. Transkriptvarianten, welche nur aus Exonen bestehen, welche weit vom 3'-Ende entfernt sind, werden nicht amplifiziert und verfälschen somit das Ergebnis (Boelens et al., 2007). Wird die Distanz zwischen der das Gen repräsentierenden Sonde auf dem Microarray und dem Poly-Adenosin-Schwanzes zu groß, kann dies zu deutlichen Verlusten und Verfälschungen während der Amplifikation führen (Boelens et al., 2007). Zudem tragen nicht alle Transkripte einen Poly-Adenosin-Schwanz (Yang et al., 2011) und können daher mit dem Eberwine-Protokoll nicht amplifiziert werden, was ebenfalls zu deutlichen Verschiebungen innerhalb der Ergebnisse führt. Mit dem hier verwendeten Exon-Array werden diese Probleme umgangen, da zur Amplifikation der mRNA randomisierte Hexanukleotide verwendet werden, welche unabhängig von der Lage an der Nukleotidsequenz binden und das Umschreiben der mRNA in cDNA initiieren können.

2.9. Bioinformatik

In den vergangenen Jahren ist die Entwicklung schnellerer und umfangreicherer Methoden zur Analyse ganzer Transkriptome und Genome im Hochdurchsatz sehr stark fortgeschritten. Die enorm großen Datenmengen, die hierbei erzeugt werden, erfordern bioinformatische Werkzeuge, welche eine automatische Analyse ermöglichen. Dies umfasst die Aufnahme der Signalintensitäten, deren Prozessierung und Umwandlung in Expressionswerte und endet nicht zuletzt bei der graphischen Darstellung der ermittelten Ergebnisse.

Für ein möglichst holistisches Verständnis der molekulargenetischen Vorgänge zu erhalten, bedarf es jedoch weiterer Analysemethoden, welche den Anwender in die Lage versetzen, aus der Menge an regulierten Genen ein Gesamtbild zu erstellen. Hierzu werden verschiedene Gruppierungsverfahren eingesetzt, welche auf unterschiedliche statistische Methoden (z.B. Hauptkomponentenanalyse (*PCA*), *linear models for microarray analysis (limma)*) und Cluster-Verfahren (z.B. *self organizing maps*, *hierachical clustering*, *k-means clustering*) zurückgreifen. Hierbei handelt es sich um rein theoretische/mathematische Verfahren, welche anhand der Expressionswerte Gruppierungen bilden und die bereits bekannten biologischen Zusammenhänge nicht mit in Betracht ziehen.

Für gut annotierte Transkriptome, wie dem des Menschen oder der klassischen Modellorganismen (z.B. Maus, Ratte, Zebrafisch), existiert die Möglichkeit die regulierten Gene anhand sogenannter GO-Termini („*gene ontology*“) zu Netzwerken zusammenzufassen (Harris et al., 2004). Hierzu werden die drei Bereiche „Molekulare Funktion“, „Zelluläre Komponente“ und „Biologischer Prozess“ unterschieden. Des Weiteren bieten unterschiedliche Programme, wie

das für die Auswertung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten verwendete Programm „GeneRanker“ der GenomatrixSuite weitere Möglichkeiten der spezifischen Analyse und Zuordnung der regulierten Gene zu kanonischen Signalwegen, Krankheiten oder spezifischen Geweben. Das Ergebnis dieser Analyse besteht schließlich in der Angabe einer Wahrscheinlichkeit, mit der die detektierten und einem Netzwerk zuteilbaren Gene, deutlich stärker vertreten sind, als man aus rein stochastischen Gründen erwarten könnte. In diesem Fall spricht man von einem „überrepräsentierten“ Netzwerk. In der vorliegenden Arbeit wurden die Filter „Biologische Prozesse“, welcher die Vorgänge in den untersuchten Gewebe beschreibt, und „canonical pathways“, welcher klassische Regulationswege, wie z.B. den WNT-Signalweg umfasst, verwendet.

2.10. Fragestellungen der Arbeit

Das Gesangssystem des Zebrafinken bildet ein ideales Modellsystem für die Untersuchung verschiedener Aspekte der sexualdimorphen, hormonabhängigen Entwicklung eines neuronalen Netzwerks. Im Zentrum dieses Gesangssystems steht der Gesangskern HVC, welcher die zentrale Schnittstelle zwischen auditorischem Input, somit der Gesangswahrnehmung, dem Gesangslernen und der Gesangsproduktion bildet. Obgleich in zahlreichen weiteren Studien die sexualdimorphe und entwicklungsabhängige Expression von Neuropeptiden (Bottjer et al., 1997), Neurotransmittern (Del Negro & Edeline, 2001), neurotrophen Faktoren (Dittrich et al., 1999, 2013; Chen et al., 2005) sowie Genen bislang unbekannter Funktion (Akutagawa & Konishi, 2001; Appeltants et al., 2003; Wade et al., 2005; Duncan et al., 2007; Tang et al., 2007; Katz et al., 2008; Duncan et al., 2010; Tang & Wade, 2012; Acharya & Veney, 2013) sowohl in der Entwicklung, als auch infolge hormoneller Einflüsse untersucht wurde, existiert bislang kein globales Bild der molekulargenetischen Vorgänge im HVC. Hierzu werden im Rahmen der vorgelegten Arbeit die folgenden Aspekte untersucht:

- Es soll untersucht werden, welche molekulargenetischen Prozesse im Zuge der Entwicklung im HVC reguliert werden. Das Hauptaugenmerk hierzu liegt auf der Analyse neurophysiologisch relevanter Gennetzwerke.
- Ferner soll analysiert werden, welche Effekte das Steroidhormon 17 β -Östradiol auf die Genexpression und die biologischen Prozesse im HVC ausübt und inwieweit die Dauer der Expositionszeit diese Faktoren verändert.
- Gemäß der „organizational/activational hypothesis“ üben Östrogene und Androgene unterschiedliche Effekte auf die Entwicklung aus, was sich in der Gesangsentwicklung einiger Singvogelarten zeigt. Hierzu soll analysiert werden, ob Androgene und Östrogene, hier 17 β -Östradiol hormonspezifisch die Genexpression, speziell biologische Prozesse im HVC, in der späten Gesangslernphase modifizieren.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Nachfolgend aufgeführt sind die wichtigsten Chemikalien und Kits, welche in den jeweiligen Arbeitsschritten verwendet wurden.

Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Wertheim, Deutschland
Cryostat CM 3050	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Gene Chip Scanner 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
PCR-Thermalcycler (Biometra-T3000)	Biometra, Göttingen, Deutschland
QIAcube	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Stereomikroskop (MZ7.5)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Transferringpipetten S (0,1 – 1 ml)	Brand, Mannheim, Deutschland
Zentrifugen	Hermle Z233 M-2, Wehingen, Deutschland

Chemikalien

17- β -Östradiol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
732 Multipurpose Sealant (Silikonmatrix)	Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ethanol (100%, Reinst.)	CARL ROTH GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Fadrozol	Roche, Basel, Schweiz
Herstellung der Implantate	Innovative Research of America, Sarasota, USA
DNA-Polymerase	Zymo Research, Freiburg i.Br. , Deutschland
Dihydrotestosteron	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Gewebekleber Surgibon	SMI, Belgien, Deutschland
Isofluran	Cp-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Lidocain/Prilocain Salbe	Emla, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland
Metacam (Wirkstoff: Meloxicam)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Oligonukleotide	Zymo Research, Freiburg i.Br. , Deutschland
PBS 10fach (Nr. 51226)	Lonza, Basel, Schweiz,
Molecular Biograde Water	5 PRIME GmbH, Hilden, Deutschland
RNAse Zap	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Testosteron	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Thionin Azetat (Salz)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tissue-Tek®	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

BioAnalyzer 2100 Pico-Chip	Agilent, Wertheim, Deutschland
Clauden-Watte	Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG, Neuwied, Deutschland
Glas Objektträger	CARL ROTH GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatokritkapillare (heparinisiert)	Brand, Wertheim, Deutschland
Injektionsnadel (26G, Neolus)	Terumo, Eschborn, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (low binding) (1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Titanpinzette	CARL ROTH GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Kits und Microarraykomponenten

Affymetrix® GeneChip® Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Affymetrix® GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
AMBION® WT Expression Kit	life Technologies, Darmstadt, Deutschland
AMBION® WT Labeling Kit	life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Array-Scanner, 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Invisorb Blood Kit	STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Deutschland
Microarray Chip (MPIO-ZF1)	Affymetrix, Santa Clara, USA
RNA 6000 Pico Assay Kit	Agilent, Wertheim, Deutschland
RNeasy® Micro Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

Radio-Immunoassay

Siehe Protokoll	(Goymann et al., 2006)
-----------------	------------------------

Software

Affymetrix Software Suite	Affymetrix, Santa Clara, USA
Genomatix Suite	Genomatix, München, Deutschland
IPA®	QIAGEN, Redwood City, USA
JMP®	SAS Campus Drive, Cary, USA
Microsoft Office Paket	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Version 21	IBM Software, Armonk, USA
Cluster 3.0	http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm (de Hoon et al., 2004)
Mendeley	http://www.mendeley.com/
R!	http://www.r-project.org/
Treeview	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html (Page, 1996)
VennDiagrammPlotter	http://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter

3.2. Tierhaltung

3.2.1. Rechtliche Grundlagen

Alle Versuchstiere wurden unter Einhaltung der EU-Richtlinie 2010/63/ [EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere] gehalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zuvor durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-66-11

3.2.2. Versuchstiere

Die folgend beschriebenen Versuche wurden an 90 männlichen Zebrafinken im Alter von 18 bis 250 Tagen durchgeführt. Sämtliche Versuchstiere entstammen der institutsinternen Brutkolonie, welche in drei Brutvolieren mit den Dimensionen 4,5m * 1,5m * 2,25m [Länge * Breite * Höhe] gezüchtet worden waren. Jede Voliere enthielt zehn Nestboxen. Der Grundbestand setzte sich aus jeweils zehn weiblichen und männlichen, mindestens ein Jahr alten Zebrafinken zusammen. Die Tiere wurden täglich mit frischem Wasser und Körnerfutter *ad libitum* versorgt. Da es sich bei Zebrafinken um opportunistische Brüter handelt, das Brutverhalten beginnt sobald ausreichend Ressourcen vorhanden sind, wurde ihnen zusätzlich zweimal wöchentlich spezielles Eifutter, Obst und Gemüse, sowie ausreichend Nistmaterial (Kokosfasern) bereitgestellt. Alle Versuchstiere blieben bis zur finalen Entnahme in den Volieren. Übrige Jungtiere wurden im Alter von ca. 60 Tagen in andere Volieren überführt.

Alle Versuchsgruppen bestanden aus jeweils sechs Tieren. Die einzelnen Versuche setzen sich aus den folgenden Gruppen zusammen:

Teilversuch 1: Ergebniskapitel 3.1

Entwicklungsstudie (gesamt 30 Tiere)

Je eine Gruppe im Alter von 19, 25, 30, 50 und 100 Tagen

Teilversuch 2: Ergebniskapitel 4.2.1

Eintagesbehandlung mit 17- β -Östradiol (gesamt 18 Tiere)

Je eine Gruppe im Alter von 19, 50 und 100 Tagen

Teilversuch 3: Ergebniskapitel 4.2.2

Siebtagesbehandlung mit 17- β -Östradiol (gesamt 18 Tiere)

Je eine Gruppe im Alter von 25, 50 und 100 Tagen

Teilversuch 4: Ergebniskapitel 4.2.8

Zwölftagesbehandlung mit Fadrozol, einem Östradiolsyntheseblocker und Östradiol (gesamt 12 Tiere)

Je eine Gruppe im Alter von 30 Tagen

Teilversuch 5: Ergebniskapitel 4.3

Siebtagesbehandlung mit Testosteron und Dihydrotestosteron (gesamt 12 Tiere)

Je eine Gruppe im Alter von 50 Tagen. Ein hybridisierter Chip aus der mit Dihydrotestosteron behandelten Gruppe, musste aufgrund schlechter Qualität verworfen werden.



Abb. 3.1. Phänotyp der in den Versuchen analysierten Zebrafinken. Obere Reihe 19, 25 und 30 Tage alte männliche Zebrafinken; Untere Reihe 50 und 100 Tage alte männliche Zebrafinken. Phänotypisch entspricht der adulte Vogel dem 100 Tage alten Tier.

3.2.3. Nestkontrolle und Beringung

Im Zuge der Tierpflege wurden alle Nestboxen täglich kontrolliert und frisch geschlüpfte Jungtiere mit einem individuellen Farbcode versehen (eingefärbte Kopffedern). Im Alter von dreizehn Tagen wurde der Farbcode durch einen zahlencodierten Ring ersetzt.

3.3. Laborarbeiten

3.3.1. Hormonimplantate

3.3.1.1. Herstellung

Zur Manipulation des Hormontiters wurden Pellets verwendet, welche subkutan auf dem Rücken der Vögel implantiert wurden. Als Träger für das 17- β -Östradiol, wie auch für das Testosteron und das Dihydrotestosteron wurde eine Silikonmatrix verwendet. Diese wurde im Verhältnis 10:1 mit jeweiligen kristallinen Hormon homogen vermischt und in einer Form (1*1*100 mm) zum Trocken ausgestrichen. Die erstarrten Silikon-Stränge wurden auf ein Gewicht von 700 μ g (\pm 50 μ g) getrimmt, was 70 μ g (\pm 5 μ g) reinem Hormon entspricht. Mit den implantierten Hormonmengen orientierte ich mich an zahlreichen Studien, in denen Zebrafinken mit Testosteron und Östradiol (Simpson & Vicario, 1991; Dittrich et al., 1999; Tang & Wade, 2012) behandelt worden sind. Kontrolltiere wurden mit Placebopellets bestehend aus reiner Silikonmatrix identischen Gewichts behandelt.

Für die Fadrozolbehandlung wurden Pellets der Firma „*Innovative Research of America*“ verwendet. Sie enthielten 1 mg Fadrozol und setzen diese Menge laut Herstellerangabe gleichmäßig über einen Zeitraum von 30 Tage frei.

3.3.1.2. Implantation

Um tageszeitabhängige Effekte auf die Genexpression zu minimieren, fanden die Implantation und somit auch die spätere Entnahme der Tiere stets im Zeitraum von 14:30 bis 15:30 Uhr statt. Ein Versuchstier wurde im Zeitraum von 5 Minuten aus der Voliere entnommen und mit dem Sedativum Meloxicam (intramuskuläre Injektion, Dosis 5 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Nach 30 Minuten wurde das Tier mit Isofluran narkotisiert (0,8% Isofluran in Sauerstoff bei 500ml/min., für maximal fünf min.) und eine Blutprobe für die Bestimmung des Bluthormontiters entnommen. Hierzu wurde die Flügelvene mit einer 26 G Nadel punktiert und ca. 100 μ l Blut in heparinisierten Hämatokritkapillaren aufgefangen und auf Eis gelagert. Die Blutung wurde, falls nötig, mit Clauden-Watte gestillt. Anschließend wurde ein kurzer Schnitt (5 mm) in die Rückenhaut gesetzt. Die oberste Dermis wurde angehoben und das Implantat in die entstandene Kavität eingeschoben. Die Wunde wurde mit Hilfe eines medizinischen Wundklebers verschlossen und mit einer kleinen Menge Lidocain-Salbe bestrichen. Nach vollständiger Regeneration wurde das Tier in die Voliere zurückgesetzt.

3.3.2. Geschlechtsbestimmung bei Zebrafinken

Da bei juvenilen Zebrafinken erst ab ca. 25 Tagen nach Schlupf eine zweifelsfreie Geschlechtsbestimmung anhand des Phänotypen möglich ist (Entwicklung des dunkleren Brustgefieders beim Männchen), musste das Geschlecht der Zebrafinken genetisch bestimmt werden. Im Alter von ca. zehn Tagen wurde im Zuge der Tierpflege eine Blutprobe entnommen. Die Flügelvene wurde mit einer 26 G Nadel punktiert und eine geringe Blutmenge (~ 5µl) in eine heparinisierte Hämatokritkapillare überführt. Das Blut wurde in 200 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gelöst und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Aus den entnommenen Blutproben wurde mit Hilfe des „Invisorb® Blood Kit“ genomische DNS extrahiert (für das Protokoll siehe Herstellerangabe). Das Geschlecht aller Versuchstiere wurde mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) und dem Auftragen des Amplikons auf ein Agarose-Gel (0,5%) ermittelt. Die verwendeten Primer sind spezifisch für das „*Chromobox Helicase DNA Binding*“ – Gen (*CDH*) sind. Dieses Gen ist bei den Vögeln hoch konserviert und existiert in zwei Varianten, welche auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind (Soderstrom et al., 2007). Im Gegensatz zu den Säugetieren ist bei den Vögeln das männliche Tier homogametisch und verfügt über zwei sogenannte „Z-Chromosomen“. Dieses enthält eine Variante des *CDH* - Gens, das als *CDH-Z* bezeichnet wird. Das weibliche Tier ist heterogametisch und besitzt neben dem Z- auch ein sogenanntes W-Chromosom. Auch dieses enthält die genetische Information für eine *CDH*-Genvariante, das *CDH-W* -Gen. Beide Varianten sind durch ein Primerpaar amplifizierbar und unterscheiden sich in ihrer Amplikongröße. Beim Weibchen ergeben sich daher zwei Banden, eine bestehend aus 389 Basen (*CDH-W*), und eine aus 359 Basen (*CDH-Z*). Beim homogametischen Männchen hingegen wird nur das z-chromosomale Produkt (359 Basen) vervielfältigt (Soderstrom et al., 2007). Für die PCR wurden die folgenden Primersequenzen und Komponenten (Tab. 3.1) verwendet:

P2: tct gca tcg cta aat cct tt

P8: cut cca agg atg agr aay tg

Tab. 3.1. Protokoll für die PCR zur Geschlechtsbestimmung anhand genomischer DNA. (a: Komponenten der Polymerasekettenreaktion, b: zeitliches Verlaufsprotokoll, Anzahl der Zyklen = 35)

a.)

Komponente	Volumen [μ l]
10-fach Puffer	1,0
MgCl	0,8
dNTPs	0,2
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Polymerase	0,5
DNS-Probe	1,0
H ₂ O	5,5

b.)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]
1. DNS - Denaturierung	94	300
2. Amplifikation		
DNA Denaturierung	94	45
Angliedern	50	60
Elongation	72	60
3. Finale Elongation	72	300
4. Halten	4	∞

3.3.3. Analyse der Hormontiter

Zur Verifizierung der Hormonimplantationen wurden die jeweils entnommenen Blutproben mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assay (RIA) analysiert. Das Grundprinzip eines RIAs besteht in der kompetitiven Bindung zweier Antigene an einem spezifischen Antikörper. Eine zu analysierende Probe, die eine unbekannte Menge an Antigen enthält, wird mit einer bekannten Menge an radioaktiv markiertem Antigen vermischt und mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Beide Antigentypen binden kompetitiv an die Antikörper. Da die Anzahl der Bindungsstellen limitiert ist und beide Antigene sich bezüglich ihrer Bindungsaffinitäten nicht voneinander unterscheiden, lässt sich aus dem Verhältnis der gebundenen Antigene Folgendes aussagen: Je größer der Anteil der bekannten Probe, desto geringer der Anteil der unbekannten Probe, der an die Antikörper gebunden hat. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden ungebundene Antigene entfernt und die von der markierten Probe ausgehende Radioaktivität bestimmt. Aus diesem Wert und einer aus bekannten Konzentrationen erstellte Standardkurve

wird schließlich die Konzentration an unbekanntem Antigen in der zu analysierenden Probe ermittelt. Für die Tiere mit Fadrozolbehandlung wurden keine Blutproben entnommen.

Das modifizierte Protokoll zur Bestimmung der jeweiligen Hormonmenge (Goymann et al., 2006; Apfelbeck & Goymann, 2011), basiert auf der Arbeit von Wingfield und Farner (Wingfield & Farner, 1975). Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Blutproben der östradiolbehandelten Tiere wurden in zwei Assays analysiert. Die Testosteron und Dihydrotestosteron behandelten Proben wurden in einem Assay analysiert. Die Ergebnisse der Hormonanalysen sind in den Abbildungen 3.2 – 3.4 dargestellt.

Für die statistische Auswertung der Hormonproben nach Hormongabe wurde in SPSS eine ANOVA innerhalb der jeweiligen Altersgruppen berechnet. Die Daten wurden *post hoc* hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit Hilfe eines Bonferoni-korrigierten T-Tests berechnet.

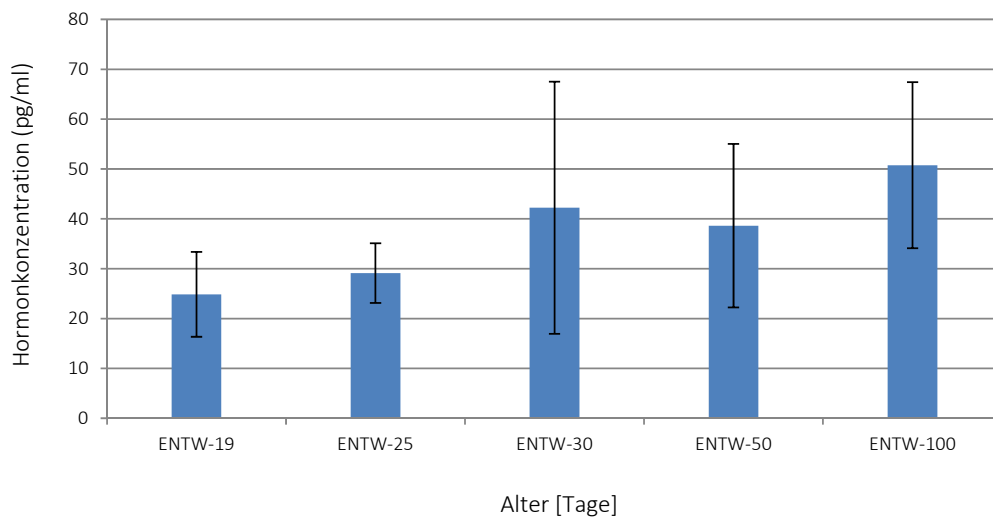


Abb. 3.2. Bluttitert für 17 β -Östradiol der Entwicklungsgruppen (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (ANOVA).

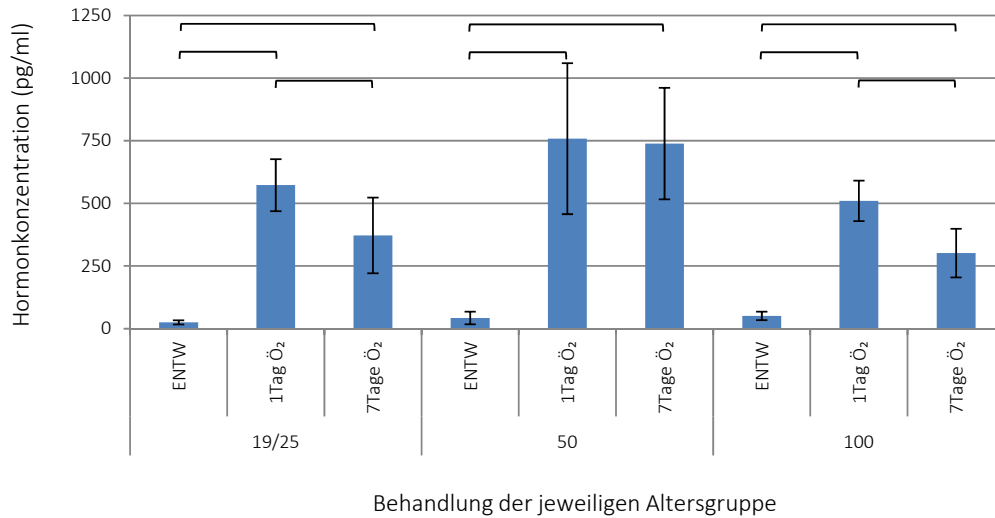


Abb. 3.3. Bluttitel für 17β-Östradiol der östradiolbehandelten Gruppen, nach ein- (1Tag-Ö₂-), sowie siebentägiger (7Tage-Ö₂-) Östradiolgabe (Mittelwert ± Standardabweichung). Zum Vergleich sind die Werte der gleichaltrigen, placebobehandelten Tiere (ENTW-) aus Abbildung 3.2 (Mittelwert ± Standardabweichung) angegeben. Die Klammern symbolisieren signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den jeweiligen Paaren. Für die Teststatistik siehe den beigelegten Datenträger.

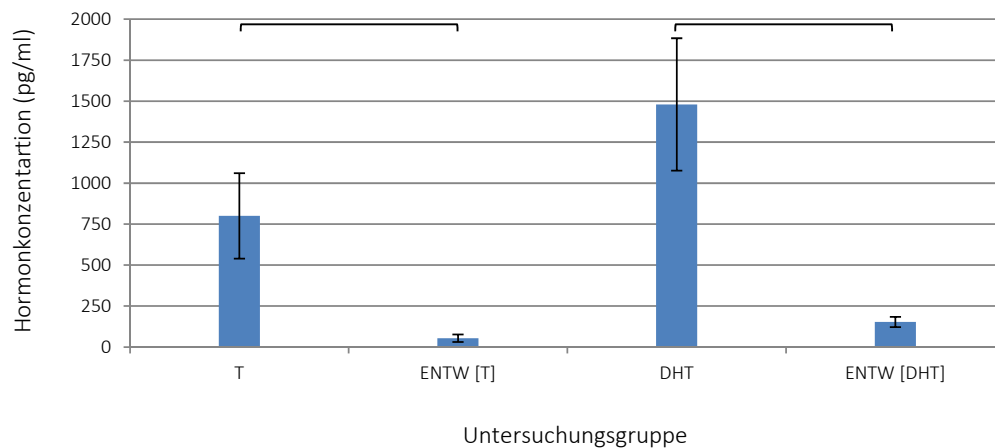


Abb. 3.4. Bluttitel der 50 Tage alten Zebrafinken, welche mit Testosteron (T), Dihydrotestosteron (DHT) oder Placebopellets behandelt wurden [ENTW-] (Mittelwert ± Standardabweichung). Da nur eine mit Placeboimplantaten behandelte Gruppe verwendet wurde, stammen die Werte für Testosteron (ENTW [T]) und Dihydrotestosteron (ENTW [DHT]) den gleichen Tieren. Die Klammern symbolisieren signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den jeweiligen Paaren. Für die Teststatistik siehe den beigelegten Datenträger.

3.3.4. Gewebeentnahme

Alle Versuchstiere wurden innerhalb von fünf Minuten nach dem Betreten der Volieren gefangen. Anschließend wurde aus der Flügelvene eine Blutprobe für die Hormontiterbestimmung nach bereits beschriebenem Protokoll (siehe Kapitel 3.2.3.2) entnommen und der Zebrafink durch eine Überdosis Isofluran (Atemstillstand für mindestens eine Minute) getötet. Das Tier wurde gewogen und dekapitiert. Mit einer Schere wurde der Schädelknochen von caudal nach rostral entlang der Mittellinie und durch zwei coronale Schnitte auf Höhe der optischen Loben geöffnet. Die Schädelknochen, wie auch die Dura, wurden vorsichtig entfernt, das Gehirn entnommen, auf Trockeneis tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.5. HVC-Präparation

In einem Cryostaten wurden die Gehirne mit einem wasserlöslichen Medium aufgeklebt, welches in gefrorenem Zustand die gleichen physikalischen Eigenschaften wie das zu schneidende Gewebe aufwies, und es wurden Sagittalschnitte (40µm Schnittstärke bei -15° bis -19° C) gewonnen. Je drei aufeinanderfolgende Schnitte wurden auf einen Glasobjektträger aufgezogen und bis zur Extraktion des HVC bei -80°C gelagert. Zum Ausschneiden des HVC-Gewebes wurde jeder Objektträger einzeln und nach einem strikten Zeitprotokoll behandelt:

- Auftauen bei 37 °C für fünf Sekunden auf dem Handrücken des Experimentators
- Fixierung in eisgekühltem Ethanol (70%, für fünf Sekunden)
- Nissl-Färbung in eisgekühlter Thioninlösung (0,05% in 70% Ethanol, für fünf Sekunden). Bei dieser Färbemethode binden Thioninkristalle an ribosomalen Proteinen des endoplasmatischen Retikulums, welches im HVC deutlich stärker ausgeprägt ist als im angrenzenden Parenchym (Peters et al., 1991; Gahr, 1997) und somit die Struktur des HVC deutlich abgrenzt. In Vorversuchen wurde kein Effekt der Thioninlösung auf die RNA-Qualität und Quantität festgestellt.
- Spülen des Objektträgers mit eisgekühltem PBS.
- Ausschneiden des HVC mittels Titanpinzetten unter einem Stereomikroskop.
- Überführen der HVC-Fragmente in 50 µl eisgekühlte, phenolhaltige QIAzol- Lösung.
- Lagerung bei -80°C bis zur Aufreinigung der RNA.

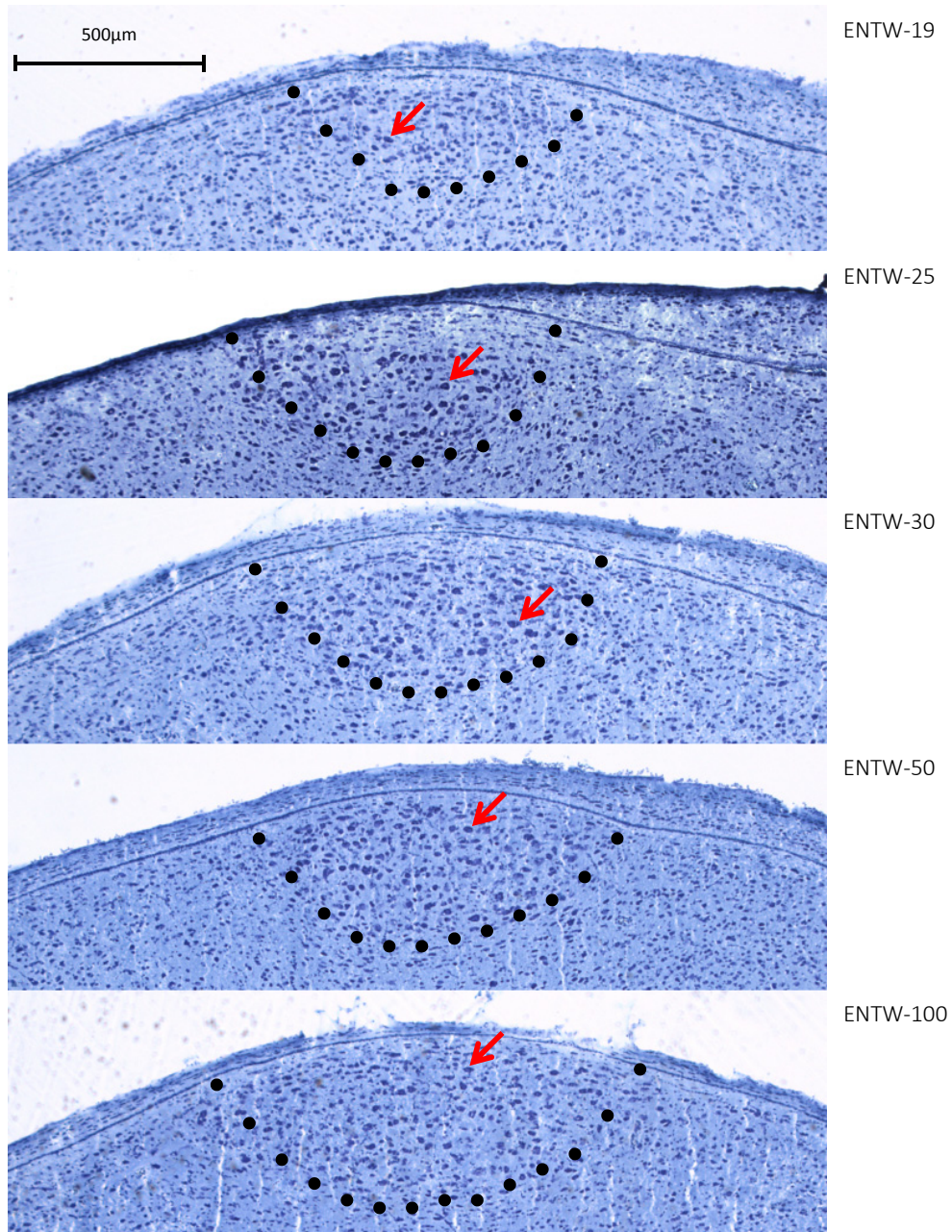


Abb. 3.5. Aufnahme zeigt Thionin-gefärbte (Nissl-Färbung) Gehirnschnitte (sagittal) des HVC (schwarz umrandet) je eines 19 (ENTW-19), 25 (ENTW-25), 30 (ENTW-30), 50 (ENTW-50), sowie eines 100 (ENTW-100) Tage alten männlichen Zebrafinken (40 μm Schnittstärke). Zu erkennen ist der HVC an der Akkumulation deutlich größerer zellulärer Strukturen (z.B. ribosomale Proteine oder Endoplasmatische Reticula (rote Pfeile)).

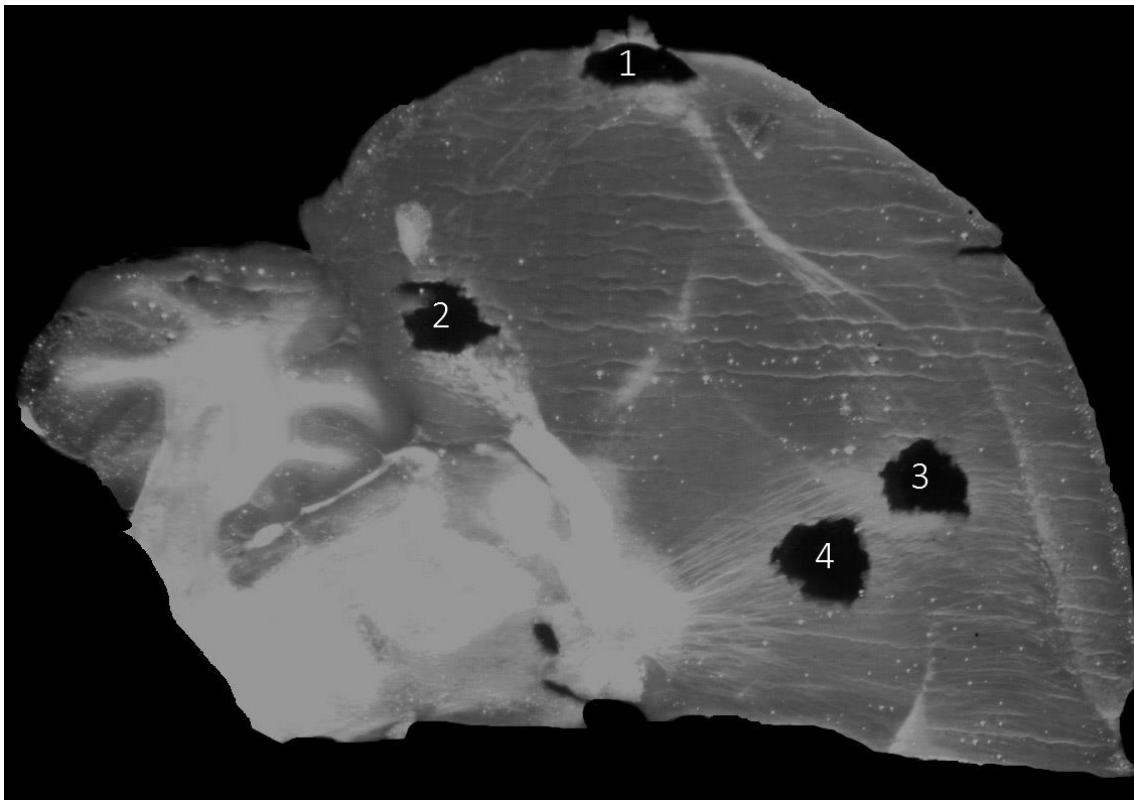


Abb. 3.6. Dunkelfeldaufnahme eines sagittalen Schnittes eines männlichen Zebrafinkengehirns, dessen Gesangskerne (1) HVC, (2) RA, (3) IMAN und (4) AreaX mit der im Text beschriebenen Methode entnommen worden sind.

3.3.6. Extraktion der RNA

RNAs sind sehr anfällig für den Abbau durch ubiquitär vorhandene RNAsen. Daher wurden sämtliche in den Versuchen verwendete Materialien zuvor gebacken (150°C, 8h) und sterile Reaktionsgefäße verwendet. Alle Oberflächen (Laborbank, Cryostat, Stereomikroskop) wurden vor der Bearbeitung der RNA mit RNaseZAP gereinigt. Für Lösungen wurde RNase freies Wasser verwendet. Für die Aufreinigung wurde das RNeasy® MicroKit mit dem Standardprotokoll „*Purification of total RNA from microdissected Cryosections*“ verwendet. Um die Variabilität während des RNA-Extraktionsprozesses zu minimieren, wurde die Extraktion von einem Pipettierroboter durchgeführt.

3.3.7. Bestimmung der RNA – Qualität und – Quantität

Qualitativ hochwertige RNA ist für Genexpressionsanalysen mittels Microarrays oder quantitativer real-time PCR unerlässlich. Dies gilt im Besonderen, wenn die verwendete RNA, wie in dieser Analyse unumgänglich, zunächst amplifiziert werden muss. Da probenbedingt für die Analyse der Gesamt – RNA sehr wenig Material zur Verfügung stand, wurde der BioAnalyzer 2100 Pico-Chip für die qualitative Analyse verwendet. Diese Technologie basiert auf der kapillarelektroforetischen Auftrennung der RNA-Stränge eines Probenaliquots (1µl, Mindestkonzentration 500 pg RNA pro µl) nach ihrer Sequenzlänge und der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion dieser Fragmente. Die Verteilung der RNA-Bruchstücke und deren relativen Häufigkeiten, insbesondere der ribosomalen RNAs (18S und 28S), ergibt Aufschluss über die Integrität der RNA, deren Kennzahl als „*RNA integrity number*“ (RIN) bezeichnet wird (Schroeder et al., 2006). Sie resultiert aus dem Abgleich des analysierten Elektroferogramms mit 1300 RNA-Proben, welche ein bekanntes charakteristisches Fragmentmuster aufweisen. Für die RIN wurden Werte zwischen „0“ (vollkommen degradiert) und „10“ (vollkommen intakt) definiert. Der Mittelwert der RIN in dieser Studie betrug 7,41, bei einer Standardabweichung von 0,67.

Zur quantitativen Bestimmung der RNA wurde der Nanodrop ND - 1000 verwendet. Bei dieser Methode wird RNA-Konzentration mit Hilfe der Absorption bestimmt. Diese wurde der RIN vorgezogen, da sie nach eigener Erfahrung bei geringen RNA-Mengen exaktere Ergebnisse liefert.

3.3.8. RNA Amplifikation und Hybridisierung der Microarray-Chips

Die aus den HVCs extrahierten Mengen an mRNA waren deutlich geringer, als für die Hybridisierung auf den Chip erforderlich. Deshalb wurden die RNA - Proben amplifiziert. Hierzu wurden, wie von Affymetrix empfohlen, das „Ambion WT Expression Kit“ und, um eine Vergleichbarkeit der Chips gewährleisten zu können, das „Ambion Poly-A RNA Control Kit“ verwendet. Letzteres enthält artifizielle Sequenzen („*spike-ins*“), welche an komplementäre Sequenzen binden, die ebenfalls auf den Chip gespottet wurden. Diese spike-ins wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Amplifikation zu den Proben gegeben. Aus ihren Signalintensitäten können schließlich Rückschlüsse über den Verlauf der einzelnen Schritte während der Amplifikation getroffen werden. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die Proben unter Verwendung des „WT-Terminal Labeling Kit“ fragmentiert und mit Biotin markiert. Abschließend wurden die Proben mit dem „Hybridisation Wash and Stain Kit“ fluoreszenzmarkiert, auf den Chips hybridisiert und in einem Scanner (GeneChip Scanner 3000 7G) eingelesen. Bei allen Schritten der Amplifikation fand das vom Hersteller empfohlene und für den Chip-Typ adäquate Protokoll Verwendung.

3.3.9. Microarray Analyse

Der erste Schritt der Analyse bestand in der Überprüfung der Qualität der erzeugten Arraydaten anhand zahlreicher von Affymetrix empfohlener Kontrollparameter. Ein Chip, der die Parameter nicht erfüllten, wurde aus der Analyse entfernt. (Ein Replikat der 50 Tage alten Zebrafinken, welche mit Dihydrotestosteron (DHT) behandelt worden war). Die ermittelten *.cel-Dateien wurden anschließend in die Genomatix Software ChipInspector eingelesen.

3.3.10. Rohdatenprozessierung

Das Prinzip der Affymetrixtechnologie basiert auf der Abbildung einer Sequenz durch mehrere sogenannten Sonden (engl. „Probe“). Eine Sonde besteht aus einer einzelsträngigen artifiziell hergestellten Sequenz und setzt sich aus 25 Nukleotiden zusammen. Diese werden beim hier verwendeten Exon-Array auf der gesamten Länge einer Sequenz verteilt und nicht wie beim 3'IVT-Chip am 3'-Ende der Sequenz akkumuliert. Der Vorteil dieser Methode besteht unter anderem darin, auch Sequenzen detektieren zu können, welche nicht über das bekannte 3'-Ende verfügen. Alle Sonden für eine Sequenz werden üblicherweise als Sondenset zusammengefasst. Zahlreiche Methoden zur Aufarbeitung der Microarray-Daten, so auch jene, die von der Affymetrixsoftware verwendet wird, basieren auf der Analyse der Sondensets. Dies bedeutet, dass ein Mittelwert für alle Sonden eines Sondensets errechnet wird. Liegt für die bekannte Sequenz nur eine Transkriptvariante vor, birgt diese Methode keinerlei Probleme. In zahlreichen Fällen ist jedoch unbekannt, wie viele Transkriptvarianten eines Gens vorliegen, was vor allem bei schlecht annotierten Transkriptomen, wie dem des Zebrafinken, der Fall sein kann und dazu führt, dass viele Sequenzen nicht berücksichtigt werden. Zudem existieren zahlreiche Genvarianten, welche nicht über das typische 3'-Ende verfügen, was bei Anwendung des klassischen Eberwins-Protokolls zur RNA/DNA-Amplifikation im Falle des 3'IVT-Chips dazu führt (Eberwine et al., 1992), dass diese Sequenz nicht vervielfältigt wird und somit aus der Analyse fällt. Um diesem Problem entgegenzutreten, bietet Genomatix die Analyse auf Sonden-Ebene, was auch die Detektion neuer Transkriptvarianten ermöglicht (Abb. 3.4). Für eine ausführliche Erläuterung dieser Methode, sowie zur im Folgenden angesprochenen statistischen Aufarbeitung der Daten verweise ich auf das Handbuch der Genomatix-ChipInspector Software („https://www.genomatix.de/download/software/ChipInspector_Manual_V2.pdf“).

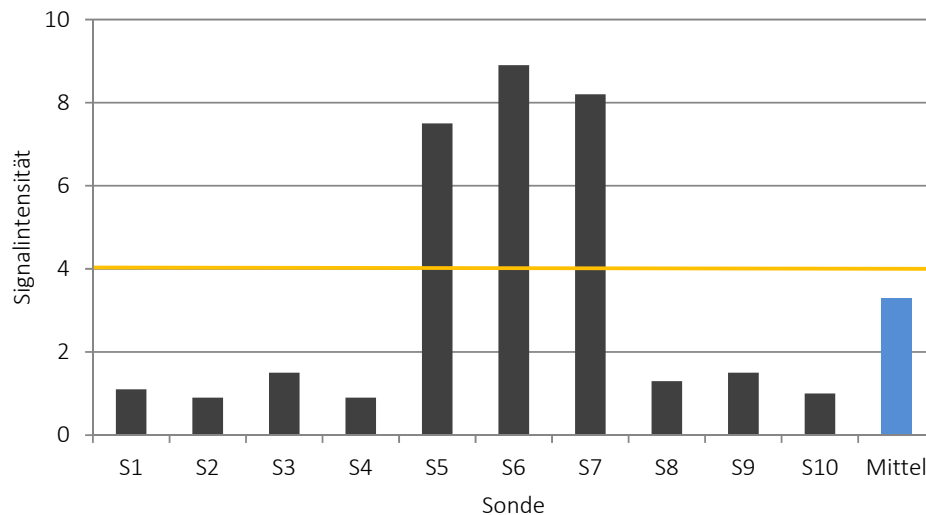


Abb. 3.7. Vergleich der herkömmlichen Methode zur Bestimmung der Signifikanz einer Sequenz, beruhend auf der Detektion des Sondensets, gegenüber der Detektion der einzelnen Sonden. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Signalintensität von zehn Sonden (S1-S10), welche ein Sondenset bilden. Die drei Sonden S5-S7 unterscheiden sich durch eine hohe Signalintensität von den übrigen. Basierend auf der herkömmlichen Methode zur Berechnung der Signalintensität als Mittelwert aller Sonden eines Sondensets, würde nun ein Wert ermittelt (blauer Balken), der das Signifikanzniveau (gelbe Linie) nicht erreicht. Die hier angewandte Methode zieht hingegen die Anzahl der signifikanten Sonden in Betracht. Im hier konstruierten Fall wären drei Sonden signifikant erhöht, die Sequenz als solche würde somit detektiert werden. (Abbildung basiert auf „https://www.genomatix.de/download/software/ChipInspector_Manual_V2.pdf“).

3.3.11. Statistik

Um technischen Fehlern Rechnung zu tragen und die Konsistenz der Daten zu erhöhen, wurden die Chipdaten auf Basis der Signalintensitäten der Sonden normalisiert. Hierzu wurde der Mittelwert der Signalintensitäten auf einen Level korrigiert. Anschließend wurde für jede Sonde der Quotient aus dem Verhältnis der Intensitäten der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe ermittelt und dieser Wert logarithmisch transformiert (\log_2). Für dies wurde ein Algorithmus basierend auf der SAM-Statistik nach Tusher et al. verwendet (Tusher et al., 2001). Prinzipiell handelt es sich bei dieser Methode um einen T-Test, der gegenüber einem permutierten Hintergrund durchgeführt wird. Als Hintergrund dient die Expressionsstärke aller Chip-Resultate der Kontrollgruppe, die randomisiert werden. Diesem Wert wird nun die Intensität jeder Sonde der behandelten Gruppe gegenübergestellt. Weicht sie um einen zuvor festgelegten Wert Δ vom Hintergrund ab, wird sie als signifikant verschieden definiert. Aus der Permutation aller Daten wird schließlich der Anteil der Proben abgeschätzt, welcher rein zufällig detektiert worden ist („ α -Fehler“). Aus dem Verhältnis der signifikanten Sonden und der fälschlicherweise detektierten Sonden, lässt sich ein Parameter ermitteln, welcher als „False Discovery Rate“ (FDR) bezeichnet wird. In allen Versuchen wurde der Wert für die FDR auf 0,0%

gesetzt, was die Anzahl der falsch-Positiven minimiert. Im Vergleich zu vielen anderen Arbeiten handelt es sich hierbei um eine sehr stringente Vorgehensweise.

3.3.12. Aufbereitung der Genexpressionsdaten

Sämtliche Expressionsunterschiede in dieser Studie wurden als relative Expression zwischen einer Versuchs- und einer Kontrollgruppe angegeben. Hierbei wurde auf weiteres Gehirnnareal als Kontrollregion verzichtet (Li et al., 2007; Kato & Okanoya, 2010; Thompson et al., 2012). Das Ziel jener Vorgehensweise ist es, Gene aus der Analyse zu entfernen, die grundsätzlich altersspezifisch expremiert werden oder einer globalen behandlungsinduzierten Expressionsänderung unterliegen. Mit dieser Vorgehensweise nimmt man in Kauf, dass Gene, welche in zahlreichen Prozessen eine Rolle spielen, eventuell von der Analyse ausgeschlossen werden. Dies kann für die Bestimmung überrepräsentierter *GO-Terms* unter Umständen die Folge haben, dass biologische Prozesse nicht mehr detektiert werden können. Zudem verdeutlicht ein Vergleich der Transkriptome der Gesangskerne unterschiedlicher Singvogelarten, dass ca. 70% aller Sonden der Microarrays abhängig vom untersuchten Gehirnnareal eine differenzierte Genexpression aufweisen (Drnevich et al., 2012). Somit bringt die Verwendung eines Kontrollgebiets zusätzlich ein hohes Maß an Variabilität in die Analyse ein. Daher wurde auf die Verwendung einer weiteren Kontrolle verzichtet.

Die mit Hilfe der Genomatix-Software erzeugten Genexpressionsdaten enthalten neben der Sequenzinformation und dem korrespondierenden Expressionswert, Informationen zum Chromosom, welches die jeweilige Sequenz enthält und zur Anzahl der signifikanten Sonden, durch welche sich die Sequenz in Versuch und Kontrollgruppe unterscheidet. Die Sequenzinformation setzt sich aus den folgenden drei Indices zusammen, was aus dem Umstand resultiert, dass die auf dem Microarray abgebildeten Sequenzen aus zwei Datenbanken stammen, die sich größtenteils überlappen; zum einen aus der GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) und zum anderen aus dem ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Gene-Id

Die Gene-Id codiert für ein Gen in der NCBI Datenbank.

Gensymbol

Das Gensymbol codiert ebenfalls für ein Gen. Ursprünglich basiert das *Gensymbol* auf der „*HUGO Gene Nomenclature Committee*“ (z.B. ESR1 für Östrogenrezeptor- α), welches an die Nomenklatur des Humangenoms angelegt ist. Da im Zeitraum des Microarray-Designs (Mai 2009 bis Dezember 2009) für die meisten Zebrafinkengene keinerlei Annotationsinformation vorlag, findet sich bei den meisten *Gensymbolen* eine Kennziffer als Platzhalter. Diese entspricht einer abgewandelten Form der *Gene-Id*. Sie wurde im späteren Verlauf der Analyse auf Basis der

Sequenzorthologie einem humanen *Gensymbol* zugeordnet, worauf im Späteren genauer eingegangen wird.

Accession number

Im Gegensatz zu den oben genannten Identifikatoren codiert die *accession number* für eine mRNA - Sequenz. Hierbei kann es sich um ein bekanntes oder ein neues, bislang weder katalogisiertes, noch annotiertes Transkript handeln.

Die genannten Parameter bilden Teil eines Kriterienkatalogs (Kriterium A - E), anhand dessen die Rohdaten gefiltert wurden, und im Folgenden beschrieben ist sind:

Kriterium A

Eine Sequenz wird durch mehrere Sonden auf dem Chip abgebildet. Um nur jene Sequenzen in die Analyse aufzunehmen, die ein konsistentes Signal zeigten, wurden im ersten Schritt alle Transkripte entfernt, die nicht durch mindestens zehn signifikant exprimierte Sonden repräsentiert waren (vgl. Abb. 3.4). Dabei gilt, dass mindestens zehn Sonden herauf- oder herabreguliert sein mussten.

Kriterium B

Als weiterer Filter wurde die Streuung der Expression herangezogen, wie schematisch dargestellt (Abb. 3.5). Hierzu wurden alle Transkripte anhand der Expressionsunterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen in Klassen mit der Klassenbreite 0,1 [logarithmierte Expressionsunterschiede, \log_2] unterteilt. Für jede dieser so bestimmten Klassen wurde der Anteil jener Transkripte bestimmt, für den die Standardabweichung des Expressionsunterschiedes größer war als der Mittelwert. Lag dieser Anteil innerhalb einer Klasse über fünf Prozent, wurde diese und alle mit geringerem Expressionsunterschied entfernt. Bei allen durchgeführten Expressionsvergleichen lag die Grenze bei einem Expressionsunterschied von 0,4 (\log_2). Somit wurden alle Transkripte aus der weiteren Analyse entfernt, die einen geringeren Expressionsunterschied als 0,5 (\log_2) aufwiesen.

Für die weitere Datenprozessierung wurden die Sequenzen nach Expressionsrichtung getrennt. Da der Microarray Sequenzinformationen zweier Datenbanken enthielt, war es notwendig duplizierte Einträge zu entfernen. Dies geschah durch einen Abgleich der *accession number*, wobei die Mehrfachnennung mit dem stärksten Expressionsunterschied in der Analyse behalten wurde. Alle übrigen wurden entfernt.

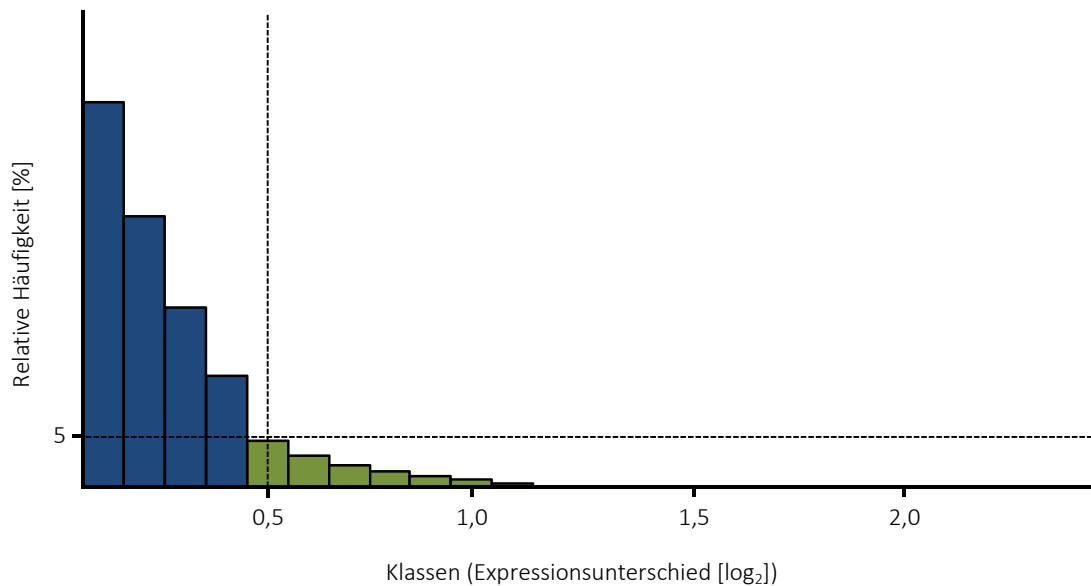


Abb. 3.8. Schematische Darstellung zur Prozessierung der Rohdaten anhand der Expressionsstärke relativ zur Standardabweichung innerhalb der Replikate. Sämtliche Sequenzen wurden anhand ihres Expressionsunterschieds in Klassen mit der Klassenbreite 0,1 eingeteilt (Abszisse) und gegenüber der relativen Häufigkeit aufgetragen, mit der der Wert der Standardabweichung den Mittelwert der jeweiligen Klasse übersteigt (Ordinate). Der Grenzwert für die relative Häufigkeit wurde auf 5% gesetzt. Alle Klassen deren Expressionsstärke unter 0,4 [log₂] überschritten diesen (blaue Balken). Somit verblieben alle Sequenzen in der Analyse, deren Unterschied $\geq 0,5$ [log₂] betrug (grüne Balken), was einem faktoriellen Unterschied von $\pm 1,41$ entspricht.

Kriterium C

Im nächsten Schritt wurden alle mehrfach vorhandenen identischen *gene-ids* innerhalb der jeweils herauf und herabregulierten Sequenzen entfernt. Anschließend wurden anhand der *accession number* Schnittmengen für die herauf- und herabregulierten Sequenzen gebildet. Alle identischen *accession numbers*, die sowohl für herauf-, als auch für herabregulierte Sequenzen codierten, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da für sie keine eindeutige Expressionsrichtung festzustellen war. Bei diesen Sequenzen könnte es sich um unbekannte Transkriptvarianten handeln, die bislang lediglich unter einer *accession number* geführt worden sind.

Kriterium D

Wie bereits bei den *accession numbers* wurden aus den verbliebenen Pools der herauf- und herabregulierten Gene Schnittmengen auf der Ebene der *gene-id* gebildet. Bei dieser Überschneidung handelt es sich um zwei unterschiedliche Sequenzen, die bereits als unterschiedliche Transkripte eines Gens beschrieben sind. Auch sie wurden aus der weiteren Analyse entfernt.

Kriterium E

Für die Analyse der Genexpressionsdaten wurden die Softwarepakete „Genomatix Suite“ und „IPA“ verwendet. Beide Programme bieten die Möglichkeit Expressionsdaten anhand verschiedenster Parameter der GO-Terms („*gene ontology*“) (Harris et al., 2004), des MeSH (*Medical Subject Headings*) oder Genomatix-spezifischer Zuordnungen (z.B. spezifische Gewebe) zusammenzufassen. Der Vorteil dieser Analysewege liegt darin, dass Gene aufgrund bereits bestehenden Wissens Signalwegen, Geweben oder Prozessen zugeordnet werden können. Da beide Softwarepakete hauptsächlich für die gängigen Modellorganismen (z.B. Zebrafisch, Maus, Ratte), für die Untersuchung von Krankheiten (Krebs, Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose, etc.) und medizinische Forschung am Menschen entwickelt werden, mussten die zebrafinkenspezifischen Sequenzen anhand der *accession number* auf humane Genbezeichnungen umgeschrieben werden. Hierzu wurde das Werkzeug „*orthology search*“ des Internet-Portals „g:Profiler“ (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gorth.cgi>) verwendet (Reimand et al., 2011).

Das Prinzip dieser Methode besteht, darin dass alle Gene soweit möglich einem Prozess zugeordnet werden. Die Anzahl der regulierten Gene eines Netzwerkes wird mit einer erwarteten Anzahl von Genen, der dem Mittel der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse entspricht, verglichen. Infolgedessen wird die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) berechnet, die eine Aussage darüber zulässt, wie stark der jeweilige Prozess in der zu untersuchenden Gruppe stärker vertreten ist, als unter normalen Umständen zu erwarten wäre. In der vorliegenden Arbeit wurden alle analysierten Versuchsgruppen anhand der *GO-Terms* „kanonische Signalwege“ und „Biologische Prozesse“ untersucht.

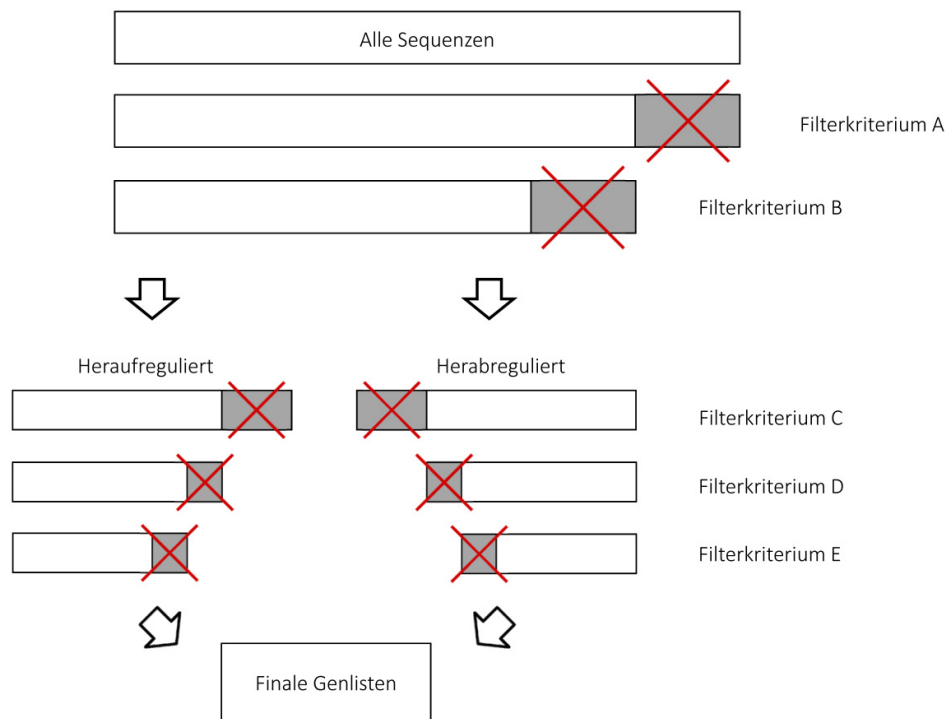


Abb. 3.9. Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Microarray-Rohdaten anhand des beschriebenen Kriterienkatalogs. Grau unterlegt jener Teil der Sequenzen, die infolge der Anwendung des einzelnen Kriteriums aus der weiteren Analyse entfernt wurden.

Durch die Anwendung des beschriebenen Kriterienkatalogs wurde die Anzahl der detektierten Sequenzen, die in die spätere Auswertung eingeschlossen sind, erheblich reduziert (Tab. 3.2a-d). Bei den verbliebenen Sequenzen handelt es sich schließlich um spezifische Gene. Diese wurden anhand der Genomatix-Werkzeuge „Gene-Ranker“ und „GePS (Pathway System)“ analysiert.

Tab. 3.2a. Veränderung der verbliebenen Sequenzen nach Anwendung der Filterkriterien A-E für die Entwicklungsstudie. Die Altersgruppen setzen sich aus 19 (ENTW – 19), 25 (ENTW-25), 30 (ENTW-30), 50 (ENTW-50) und 100 (ENTW-100) Tage alten Zebrafinken zusammen.

		ENTW-19		ENTW-25		ENTW-30		ENTW-50		ENTW-100	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Rohdaten		18675	23304	6106	23177	8458	23227	8646	20709	15284	21210
Filterkriterium	A	9165	13891	2971	13136	3088	12984	3651	11314	6447	12000
	B	5364	10090	2405	12568	2290	12186	3097	10761	4796	10350
	C	2610	5013	1098	5898	1099	5850	1450	5324	2274	5100
	D	2423	4677	1015	5422	1009	5374	1323	4928	2079	4733
Finale Daten		2233	3842	945	4997	892	4558	1154	4084	1821	3979

Tab. 3.2b. Veränderung der verbliebenen Sequenzen nach Anwendung der Filterkriterien A-E für die Versuche mit eintägiger Östradiolbehandlung. Die Versuchsgruppen setzen sich aus 19 (1Tag-19-Ö₂), 50 (1Tag-50-Ö₂) und 100 (1Tag-100-Ö₂) Tage alten Zebrafinken zusammen.

		1Tag-19-Ö ₂		1Tag-19-Ö ₂		1Tag-19-Ö ₂	
		+	-	+	-	+	-
Rohdaten		10624	18395	12648	23548	5149	29146
Filterkriterium	A	1948	4858	2135	5036	1226	7414
	B	1331	4392	1901	4801	792	6980
	C	1094	2852	1020	2527	519	4014
	D	802	2519	1000	2492	513	3950
Finale Daten		590	1789	807	1972	387	2809

Tab. 3.2c. Veränderung der verbliebenen Sequenzen nach Anwendung der Filterkriterien A-E für die Versuche mit siebentägiger Östradiolbehandlung. Die Versuchsgruppen setzen sich aus 25 (7Tage-25-Ö₂), 50 (7Tage-50-Ö₂) und 100 (7Tage-100-Ö₂) Tage alten Zebrafinken zusammen.

		7Tage-25-Ö ₂		7Tage-50-Ö ₂		7Tage-100-Ö ₂	
		+	-	+	-	+	-
Rohdaten		23624	14782	17902	11096	19222	15305
Filterkriterium	A	11429	2755	8333	4860	9691	8043
	B	9084	1305	6849	3514	4990	3538
	C	4478	691	4595	2232	4290	3042
	D	4100	644	3697	1867	3556	2783
Finale Daten		3559	566	3207	1702	3412	2642

Tab. 3.2d. Veränderung der verbliebenen Sequenzen nach Anwendung der Filterkriterien A-E für die Versuche mit Androgenbehandlung. Die Versuchsgruppen setzen sich aus 50 Tage alten Zebrafinken zusammen, welche für sieben Tage mit dem nicht aromatisierbaren Dihydrotestosteron (7Tage-50-DHT) oder Testosteron (7Tage-50-T) behandelt wurden.

		7Tage-50-DHT		7Tage-50-T	
		+	-	+	-
Rohdaten		22074	11427	22671	14304
Filterkriterium	A	16224	7413	17274	10531
	B	13182	4372	12178	5435
	C	6583	2497	6053	3124
	D	5045	2086	4520	2548
Finale Daten		4790	1991	4260	2421

Tab. 3.2e. Veränderung der verbliebenen Sequenzen nach Anwendung der Filterkriterien A-E für die Versuche mit zwölftägiger Fadrozol- und Östradiolbehandlung. Die Versuchsgruppen setzen sich aus 30 Tage alten Zebrafinken zusammen, welche für 12 Tage mit Östradiol (12Tage-30-Ö₂) oder dem Östrogensyntheseinhibitor Fadrozol (12Tage-30-FAD) behandelt wurden.

		12Tage-30-Ö ₂		12Tage-30-FAD	
		+	-	+	-
Rohdaten		20619	10320	18469	12015
Filterkriterium	A	7670	2290	9177	5170
	B	4895	1064	5126	3116
	C	3641	841	3684	2841
	D	3409	766	3379	2492
Finale Daten		3408	698	3189	1853

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklungsstudie

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse der Entwicklung des HVC auf der Ebene der Genexpression, welche die HVC-abhängige molekulare Grundlage für das Erlernen und die Produktion des Gesangs bildet. Hierzu wurden je sechs männliche Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten während der Gesangslernphase getötet und deren HVC entnommen. Anschließend wurde das Transkriptom mittels Microarrayanalysen bestimmt und die Genexpression mit dem adulter, männlicher Zebrafinken verglichen. Die Gruppen setzen sich aus folgenden Alters- bzw. Entwicklungsstadien zusammen:

Gruppe eins („ENTW-19“) bestand aus 19 Tage alten Vögeln (N=6). Zebrafinken haben in diesem Alter die sensorische Phase des Gesangslernens noch nicht erreicht (Immelmann, 1969; Böhner, 1990). Gruppe zwei („ENTW-25“) umfasste 25 Tage alte Zebrafinken (N=6). In diesem Alter beginnt die sensorische Phase (Immelmann, 1969; Price, 1979; Eales, 1985; Clayton, 1988). Gruppe drei („ENTW-30“) rekrutierte sich aus 30 Tage alten Zebrafinken, welche sich im Bereich des Übergangs in die sensomotorische Phase befanden (N=6) (Arnold, 1975; Nottebohm, 1992; Zann, 1996). Gruppe vier („ENTW-50“) wurde von 50 Tage alten Zebrafinken gebildet (N=6). Solche Vögel befinden sich in der sensomotorischen Phase des Gesangslernens (Immelmann, 1969; Eales, 1985). Der Gesang von Zebrafinken dieses Alters weist bereits Ähnlichkeit zum späteren Adultgesang auf (Zann, 1996). Die fünfte Gruppe („ENTW-100“) bildeten 100 Tage alte Zebrafinken (N=6). Der Gesang solcher Vögel war vollständig kristallisiert gewesen, ihre Gesangslernphase somit beendet (Immelmann, 1969; Arnold, 1975; Morrison & Nottebohm, 1993). Adulte Zebrafinken Männchen fungierten als Referenzgruppe („ADULT“). Sie waren über 250 Tage alt und hatten einmal erfolgreich gebrütet (N=6).

4.1.1. Korrelationsanalyse der Entwicklungsgruppen

Im ersten Schritt wurde auf der Basis einer Korrelationsanalyse die Ähnlichkeit der fünf Versuchsgruppen analysiert. Um ein möglichst umfangreiches und exaktes Abbild zu erhalten, wurde der Vergleich auf der Ebene der signifikant regulierten Sequenzen und nicht auf Ebene der Genprodukte, hierbei kann es sich um ein oder mehrere Transkriptvarianten handeln, durchgeführt. Ursächlich hierfür ist, dass ein Genprodukt durch mehrere Sequenzen auf dem

Microarray-Chip abgebildet ist. Der für ein Gen ermittelte Expressionsunterschied setzt sich daher aus den Werten für mehrere Sequenzen zusammen. Daher sind alle Sequenzen in die Analyse eingeflossen, welche nach Anwendung des Filterkriteriums B in der Analyse verblieben waren (zur Erläuterung der Filterkriterien siehe Material und Methoden, 3.3.11). Alle anschließenden Analysen erfolgten auf der Ebene der Genexpression.

Die Korrelationsanalyse zeigte, dass die Ähnlichkeit der HVCs zweier Gruppen nicht durch das Alter der Tiere, sondern vielmehr durch den Entwicklungsgrad bedingt war. Zwar nahm für die Entwicklungsgruppe ENTW-19 die Stärke der Korrelation mit zunehmendem Alter der Vergleichsgruppe ab (ENTW-19 – ENTW-25, $R^2 = 0,42$; ENTW-19 – ENTW-30, $R^2 = 0,39$; ENTW-19 – ENTW-50, $R^2 = 0,20$; ENTW-19 – ENTW-100, $R^2 = 0,09$). Jedoch wiesen zwei Gruppenpaare auffallend hohe Korrelationen auf (Abb. 4.1). Zum einen war dies das altersähnlichste Paar ENTW-25 und ENTW-30 ($R^2 = 0,72$). Die Vögel beider Gruppen befanden sich am Beginn des Gesangslernens. Im Alter von 25 bis 35 Tagen nach dem Schlupf wird die Verbindung vom HVC mit dem Gesangkern RA geschlossen, und männliche Zebrafinken sind in der Lage erste gesangsähnliche Töne zu vokalisieren (Mooney & Rao, 1994). Auffallend ist, dass beide Gruppen eine deutlich schwächere gegenüber den nur wenig jüngeren Tieren der Gruppe ENTW-19 aufwiesen.

Zum anderen korrelierten die Expressionswerte der beiden ältesten Altersgruppen ENTW-50 und ENTW-100 deutlich stärker miteinander ($R^2 = 0,70$) als mit den übrigen Gruppen. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass sich die Genexpressionsmuster im HVC der Vögel der beiden Gruppenpaare ENTW-25/30 und ENTW-50/100 sehr stark ähnelten, womit sich die Entwicklungsstufe und nicht so sehr das Alter in der Ähnlichkeit widerspiegelt. Durch Untersuchungen der funktionellen Geninteraktionen wird die Ähnlichkeit der Gruppen später detaillierter betrachtet (siehe 4.1.4.3).

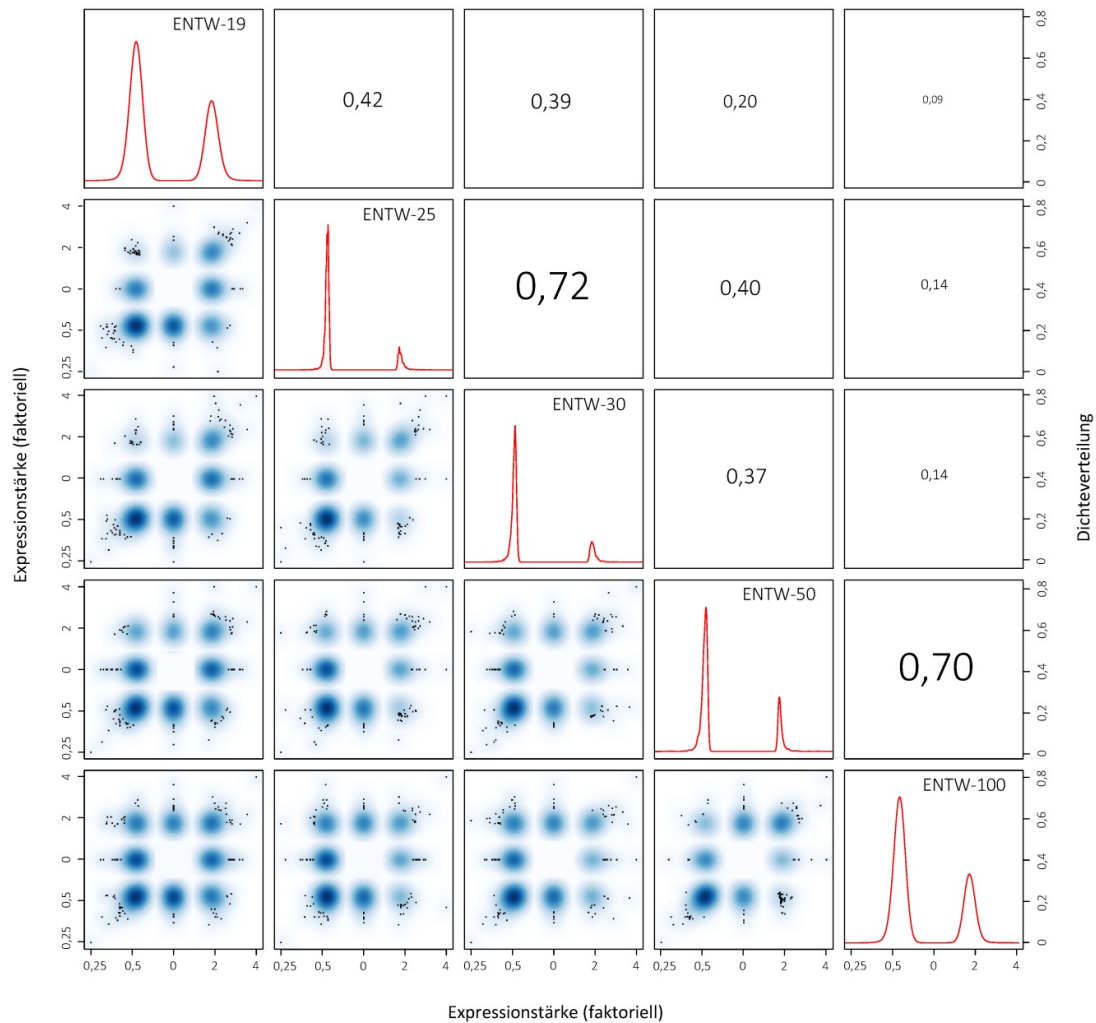


Abb. 4.1. Korrelationen aller relativ zu den adulten Tieren regulierten Sequenzen (Expressionsunterschied $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0), welche nach Anwendung des Filterkriteriums B in der Analyse verblieben waren. Dies entsprach allen signifikanten Sequenzen. Die Abbildung zeigt die Werte für die Korrelationsstärke der Altersgruppen (rechter oberer Teil der Abbildung) und die Verteilung der Expressionswerte (linker unterer Teil der Abbildung). Die Diagonale zwischen den beiden Graphen veranschaulicht die Dichteverteilung der Expressionswerte der fünf Gruppen. Ordinate und Abszisse in den graphischen Untereinheiten geben den faktoriellen Expressionsunterschied relativ zu den adulten Kontrollvögeln an. Verglichen wurden die fünf Entwicklungsgruppen ENTW-19, ENTW-25, ENTW-30, ENTW-50 und ENTW-100. Festzuhalten ist, dass Entwicklungseffekte die Ähnlichkeit stärker beeinflussen, als das Alter der Tiere, was an den beiden Paaren ENTW-25/ENTW-30 bzw. ENTW-50/ENTW-100 deutlich wird.

Alle nachfolgenden Analysen wurden auf der Ebene der Genexpression (mRNA) und nicht der Sequenzen durchgeführt.

4.1.2. Anzahl der regulierten Gene

In allen fünf Gruppen zusammengekommen waren 8774 Gene signifikant reguliert (Expressionsstärke $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0). Die Anzahl der regulierten Gene betrug zwischen 5238 für ENTW-50 und 6075 für ENTW-19 (Abb. 4.2). Dies verdeutlichte, dass sich alle fünf Gruppen bezüglich ihres Transkriptoms erheblich von den Kontrolltieren unterschieden. Die Mehrzahl der Gene war signifikant herabreguliert und umfasste zwischen 3842 Gene für ENTW-19 und 4997 Gene für ENTW-25. Deutlich geringer war die Anzahl der signifikant heraufregulierten Gene. Ihre Anzahl betrug zwischen 892 für ENTW-30 und 2233 für ENTW-19.

Festzustellen war eine deutliche Veränderung der Expressionsrichtung der regulierten Gene mit Beginn der sensorischen Phase des Gesangslernens. Während bei der jüngsten Altersgruppe (ENTW-19) 2233 signifikant heraufregulierte Gene detektiert werden konnten, war deren Anzahl bei den sechs Tage älteren ENTW-25 mit 945 deutlich geringer, erreichte bei ENTW-30 mit 892 ein Minimum und stieg mit zunehmendem Alter wieder an (Abb. 4.2). Für die herabregulierten Gene war ein gegenläufiger Trend zu beobachten, wobei die Anzahl der regulierten Gene bei ENTW-19 ein Minimum, bei ENTW-25 ein Maximum erreichte und schließlich mit zunehmendem Alter zurückging. Besonders verdeutlichte sich diese gegenläufige Entwicklung im Verhältnis der herauf- zu herabregulierten Gene (Tab. 4.1). Bei ENTW-19 lag dieser Quotient bei 1:1,7. Bei den nur wenig älteren Tieren der Altersgruppe ENTW-25 fiel er mit 1:5,3 deutlich geringer aus, stieg mit zunehmendem Alter über 1:5,1 bei ENTW-30 und 1:3,5 bei ENTW-50 auf 1:2,2 bei ENTW-100 an und erreichte damit beinahe den Wert der jüngsten Versuchsgruppe. Diese deutliche Verschiebung in der Genexpressionsrichtung wies auf die zunehmende Inaktivierung der Genomtranskription zu Beginn der Gesangslernphase hin.

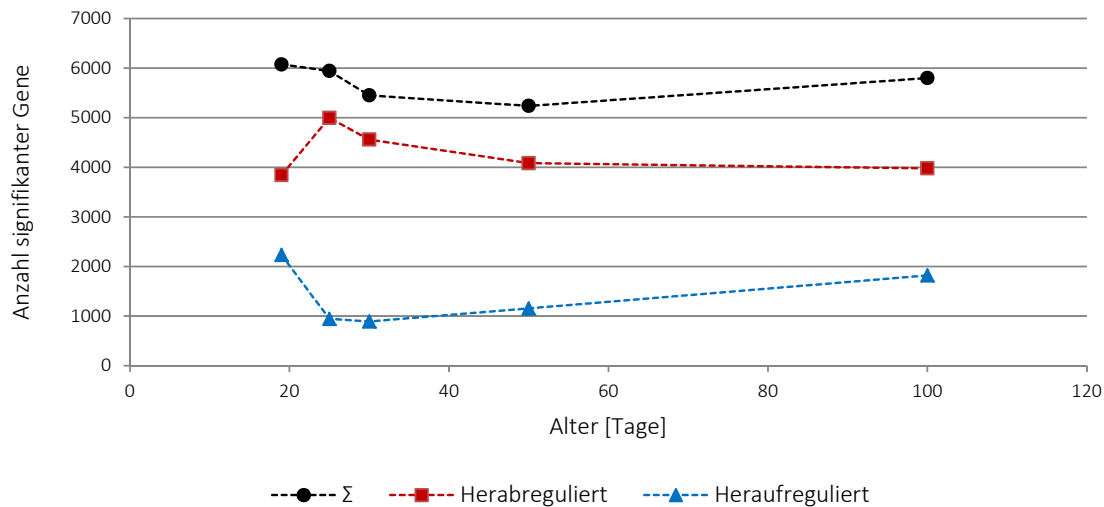


Abb. 4.2. Anzahl der relativ zu den Adulten signifikant unterschiedlich regulierten Gene im HVC während der Entwicklung des Gesangslernens (Expressionsstärke $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der absoluten Anzahl (schwarz), und nach Unterteilung in herab- (rot) und heraufregulierte (blau) Gene.

Tab. 4.1. Angabe der Expressionsmaxima und –minima (faktorieller Unterschied), sowie der Quotienten der Anzahl herauf- zu herabregulierter Gene im HVC männlicher Zebrafinken bei den fünf untersuchten Entwicklungsstadien (ENTW). Höhere Expressionsmaxima traten in Entwicklungsstadien auf, die durch eine größere Anzahl herunterregulierter Gene charakterisiert waren. (ENTW-19 = 19 Tage alt; -25, -30, -50 und -100 = Alter in Tagen).

	ENTW-19	ENTW-25	ENTW-30	ENTW-50	ENTW-100
heraufreguliert	4,11	6,45	6,23	4,69	3,63
herabreguliert	0,23	0,25	0,24	0,28	0,30
Verhältnis	1:1,7	1:5,3	1:5,1	1:3,5	1:2,2

4.1.3. Schnittmengen der Entwicklungsgruppen

Entwicklungsabschnitte werden durch die zeitweilige Veränderung in der Aktivität von Genkaskaden reguliert (vgl. Funktion der *HOX*-Gene für die Entwicklung spezifischer Körperregionen). Zur Analyse jener Gennetzwerke, die die Entwicklung des HVC während des Gesangslernens steuern, wurden daher Schnittmengen der Gene aller Altersgruppen gebildet, die stadienspezifisch oder Stadien übergreifend aktiv waren (Abb. 4.3), und nach Expressionsrichtung differenziert analysiert (Abb. 4.1). Zur graphischen Darstellung aller Schnittmengen wurden Venn-Diagramme gewählt.

Alle fünf Altersgruppen unterschieden sich unabhängig von der Richtung der Regulation durch 2233 Gene von den adulten Zebrafinkenmännchen. Dies entsprach 25,4% aller signifikant regulierten Gene. 1660 Gene wurden in allen Gruppen in gleicher Weise reguliert, wobei der Großteil dieser Gene in allen fünf Entwicklungsgruppen signifikant herabreguliert ($n=1431$) und lediglich 229 signifikant heraufreguliert waren. Die zu den 2233 noch fehlenden 573 Gene, wurden in mindestens zwei der fünf Altersgruppen gegenläufig gegenüber den Adulten reguliert. Dieses Resultat überraschte insofern, da allgemein davon ausgegangen wurde, dass die größte Dynamik in der Genexpression im HVC in den ersten beiden Lebensmonaten stattfindet. In diesem Alter differenziert sich der HVC am stärksten und die Vögel erlernen ihren Gesang (Böhner, 1990; Nixdorf-Bergweiler, 1996; Zann, 1996; Gahr & Metzdorf, 1999). Bei der funktionellen Analyse ließen sich die in allen Entwicklungsstadien gleichsinnig regulierten Gene zwei Signalwegen zuordnen, die mit Lernvorgängen in Zusammenhang gebracht werden konnten (siehe 4.1.4.2).

Bei Betrachtung der altersspezifischen Schnittmengen fiel auf, dass sich ENTW-19 von den übrigen vier Entwicklungsgruppen dadurch unterschied, dass nicht nur die Gesamtanzahl der regulierten Gene am größten war ($n=526$), sondern auch die Anzahl der herabregulierten Gene ($n=329$) deutlich über den heraufregulierten Genen ($n=197$) lag (Abb. 4.3). Bei allen übrigen Entwicklungsgruppen lag die Anzahl der stadienspezifischen, negativ regulierten deutlich höher als die Anzahl der positiv regulierten.

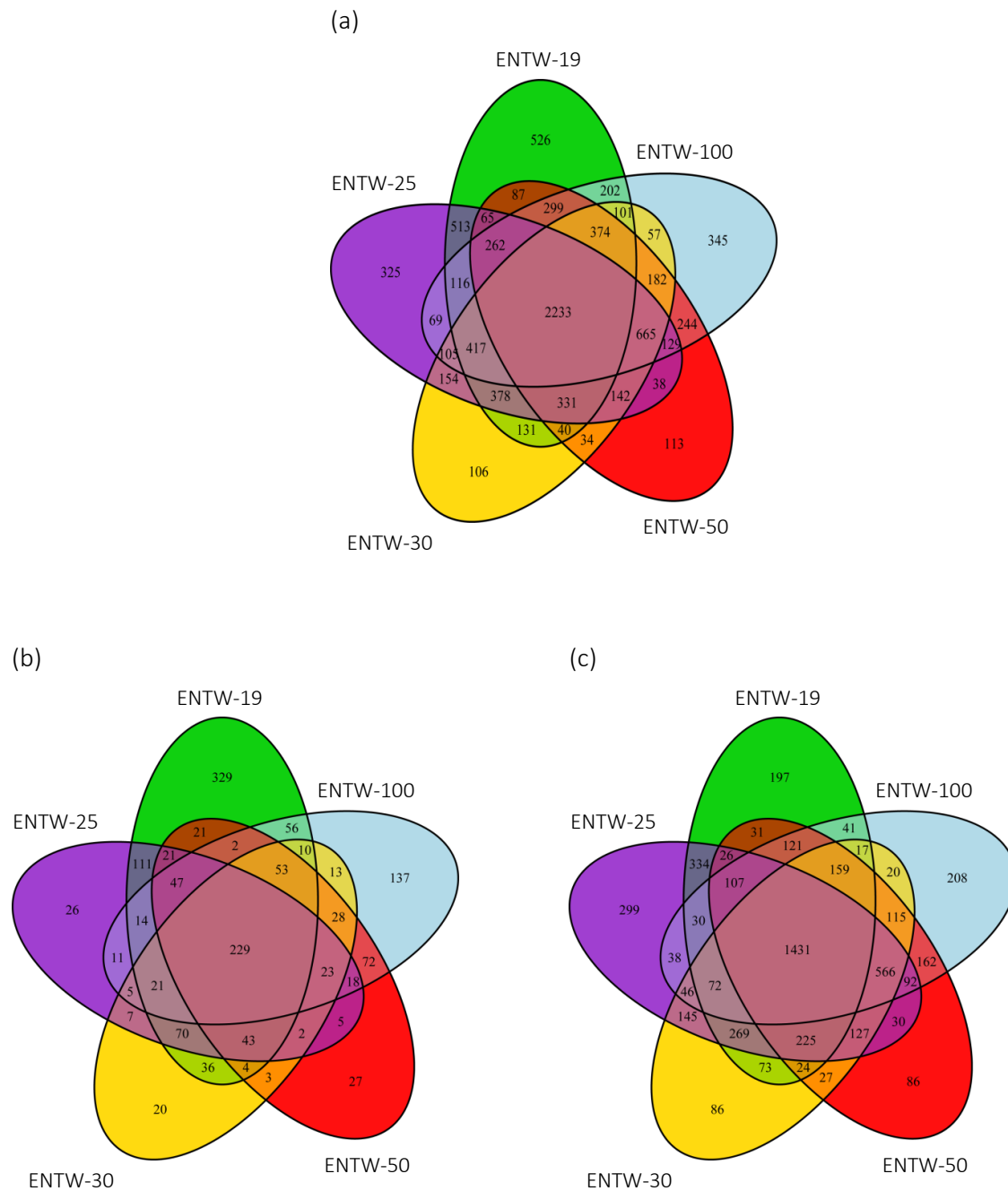


Abb. 4.3. Schnittmengen aller relativ zu den Adulten signifikant regulierten Gene (Expressionswert $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0) der fünf Entwicklungsstadien insgesamt (4.3a) und aufgeschlüsselt nach Herabregulation (4.3b) und Heraufregulation (4.3c). Die überlappenden Flächen in den Venn-Diagrammen geben die Anzahl jener Gene an, die in den jeweiligen Entwicklungsstadien signifikant reguliert waren.

4.1.4. Kanonische Signalwege in den Entwicklungsgruppen

Um zu untersuchen, ob Veränderungen der Genexpression im HVC, die in den verschiedenen Entwicklungsgruppen festgestellt wurden, mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit bestimmte zelluläre Signaltransduktionswege beeinflussten, wurden die entsprechenden Genlisten mit Hilfe des Genomatixwerkzeugs „Canonical pathway analysis“ untersucht. Dabei wird für jeden kanonischen Signaltransduktionsweg die Wahrscheinlichkeit („p-Wert“) bestimmt, mit der er in einer Genliste durch eine größere Anzahl an Genen repräsentiert ist, als unter Normalbedingungen zu erwarten ist. Im Folgenden wird auf jene kanonischen Signalwege eingegangen, deren p-Wert unter $1 \cdot 10^{-4}$ lag. Eine weitere Liste der mit $p \leq 1 \cdot 10^{-2}$ signifikant veränderten kanonischen Signalwege kann dem Anhang entnommen werden, wird aber nicht weiter diskutiert.

4.1.4.1. Stark überrepräsentierte kanonische Signalwege in den Entwicklungsgruppen

Die Untersuchung der fünf Entwicklungsgruppen ergab, dass die drei am stärksten überrepräsentierten Signalwege durch einen Pool an beinahe identischen Genen beschrieben wurden. Es handelte sich bei den Signalwegen um zwei Varianten des „*AKT(PKB)-BAD signaling*“ Signalweges, bei denen die Aktivierung auf die Wirkung von „*Interleukin 7*“ (*IL7*) bzw. „*Erythropoietin*“ (*EPO*) zurückgeführt werden kann, und den durch „*Vascular endothelial growth factor*“ (*VEGF*) stimulierten Signalweg („*VEGF-signaling pathway*“) (Tab. 4.2). Im Säugerhirn können alle drei Signalwege einen Einfluss auf das Schicksal neu geborener Zellen ausüben. *VEGF* spielt eine Schlüsselrolle bei der Angio- und Vaskulogenese (für Übersichtsartikel siehe: Chen et al., 2013) und beeinflusst dadurch die Rekrutierung neu geborener Zellen (Grunewald et al., 2006). Im Hippocampus der Maus spielt *EPO* eine neuroprotektive Rolle (Sasaki, 2003). *IL7* wirkt sich positiv auf das Überleben neuer Neurone aus und fördert ihr axonales Wachstum (Michaelson et al., 1996). Neben *VEGF* konnten zwei weitere Signalwege detektiert werden, die in den Genlisten der Entwicklungsstadien stark überrepräsentiert waren. Bei deren namensgebenden Genen handelte es sich um den Wachstumsfaktor „*Epidermal growth factor*“ (*EGF*) und den Rezeptor B des „*Platelet-derived growth factor*“ (*PDGFR-β*), welche zudem eine Rolle bei der Angiogenese spielen (Suhardja & Hoffman, 2003; für Übersichtsartikel siehe: Lee et al., 2013).

Vier weitere überrepräsentierte Signalwege fungieren als Regulative bei der Ausbildung und Unterhaltung von Interaktionen zwischen Zellen und mit der extrazellulären Matrix. Der Signalweg „*Ephrin B reversen signaling pathway*“ spielt eine essentielle Rolle bei der axonalen Wegfindung, wie z. B. bei der Entwicklung der retinalen Ganglienzellen (Triplett & Feldheim, 2012). Dabei modifizieren Ephrine die Zytoskelettstruktur und ermöglichen das Einwachsen von Projektionsneuronen. Da dieser Signalweg nur in der Gruppe ENTW-19, und somit nur vor der

Innervierung des RA durch den HVC (Mooney & Rao, 1994) nicht signifikant reguliert wurde, könnte er eine vergleichbare Rolle im Gesangssystem spielen. Der Signalweg „*Integrin signaling pathway*“ übermittelt Signale aus der extrazellulären Matrix in die Zelle, wobei infolge der Bindung von Liganden, wie Lamininen, Fibronektinen oder Kollagenen, eine Konformationsänderung einer zytoplasmatischen Proteinkinase (PTK) induziert wird (Kumar, 1998). Dies aktiviert weitere Signaltransduktionskaskaden. Zu diesen PTKs wird das Gen „*Tyrosin kinase 2*“ (PTK2) gezählt, das auch unter dem Synonym „*Focal adhesion kinase*“ (FAK) beschrieben ist. Es wurde als erstes Gen der Integrin-abhängigen Signaltransduktion entdeckt (Andre & Beckerandre, 1993) und ist namensgebend für den signifikant überrepräsentierten Signalweg „*Signaling events mediated by focal adhesion kinase*“. Beim vierten Signalweg, welcher Zell-Zell/Matrix-Interaktionen dient, fungiert „*N-cadherin*“ (CDH1) als transmembranes Adhäsionsmolekül. Bei Säugetieren geht eine Expressionsänderung der verschiedenen Cadherin-Varianten mit morphogenetischen Modifikationen einher (Stemmler, 2008). Cadherine regulieren die Zellmigration und sind konzentriert in „*Adherens junctions*“ zu finden (Bunse et al., 2013; Indra et al., 2013). Im Zentrum des detektierten Signalwegs steht das Zelladhäsionsmoleküle „*CateninD1*“ (CTNND1). Es bildet synaptische Zelladhäsionen, stabilisiert die extrazelluläre Matrix und dient als membranständiges Signalmolekül (Brigidi & Bamji, 2011).

Tab. 4.2. Kanonische Signalwege, die im Rahme einer „Canonical Pathway Analysis“ (Genomatix) der relativ zu den Adulten unterschiedlich exprimierten Gene als signifikant überrepräsentiert detektiert wurden ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}), mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt. Für jedes Entwicklungsstadium ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalweges angegeben.

ENTW19	ENTW25	ENTW30	ENTW50	ENTW100		
1:1,7	1:5,0	1:4,4	1:5,0	1:3,9	AKT(PKB)-BAD SIGNALING (IL-7 SIGNALING(JAK1 JAK3 STAT5))	-7
1:1,7	1:5,0	1:4,4	1:5,0	1:3,9	AKT(PKB)-BAD SIGNALING (EPO SIGNALING PATHWAY(JAK2 STAT1 STAT3 STAT5))	-6
1:1,7	1:5,2	1:5,0	1:4,9	1:3,9	GENE EXPRESSION (VEGF SIGNALING PATHWAY)	-5
1:1,7	1:2,8	1:2,5	1:3,3	1:2,6	EGF SIGNALING PATHWAY	-4
1:1,1				1:2,1	PDGFR-BETA SIGNALING PATHWAY	-3
	1:2,3	1:2,4	1:2,6	1:2,0	EPHRIN B REVERSE SIGNALING	-2
	1:2,1	1:2,0	1:1,9	1:1,8	INTEGRIN SIGNALING PATHWAY	
1:0,9	1:1,6	1:3,0	1:1,9	1:1,2	N-CADHERIN SIGNALING EVENTS	
	1:3,6				SIGNALING EVENTS MEDIATED BY FOCAL ADHESION KINASE	
	1:4,9	1:3,0		1:3,0	TRANSCRIPTION FACTOR CREB AND ITS EXTRACELLULAR SIGNALS	
				1:1,7	INSULIN PATHWAY	

Der Signalweg „*Transcription factor CREB and its extracellular signals*“ ist an zahlreichen Signalkaskaden beteiligt, bei denen externe Stimuli, wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor „*cAMP response element-binding protein*“ (*CREB1*) die Genexpression modifizieren. Da *CREB1* speziell für die Bildung von Langzeitpotenzierungen und somit bei der Gedächtnisbildung von Bedeutung ist, wurde es hauptsächlich bei den klassischen Modellorganismen (Dash et al., 1990), aber auch beim Zebrafinken untersucht (Sakaguchi et al., 1999).

Der letzte stark überrepräsentierte Signalweg, „*Insulin pathway*“, reguliert im Zusammenspiel mit Glucagon die Aufnahme von Glucose in die Zelle. Für der Entwicklung des Mausgehirns kommt Insulin eine wichtige Rolle zu, da es hier neurotrophe Funktionen übernimmt (Ye et al., 1996).

Bei Betrachtung der Verhältnisse aller herauf- zu herabregulierten Gene innerhalb eines Signalweges, zeigte sich erneut eine deutliche Veränderung zwischen den Altersstufen ENTW-19 und ENTW-25. Während in der Gruppe ENTW-19 bei den meisten oben beschriebenen Signalwegen weniger als doppelt so viele Gene herab- wie heraufreguliert wurden, war die relative Anzahl der herabregulierten Gene bei allen älteren Gruppen deutlich erhöht. Nur der Signalweg „*N-cadherin signaling events*“ der Gruppe ENTW-19 stellte eine Ausnahme dar, da zu diesem Zeitpunkt und nur bei diesem Signalweg mehr Gene herauf- als herabreguliert wurden.

4.1.4.2. Expressionsmuster kanonischer Signalwege in den Entwicklungsgruppen

Die folgenden fünf Signalwege waren in allen Entwicklungsgruppen stark überrepräsentiert ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$) (vgl. Tab. 4.2):

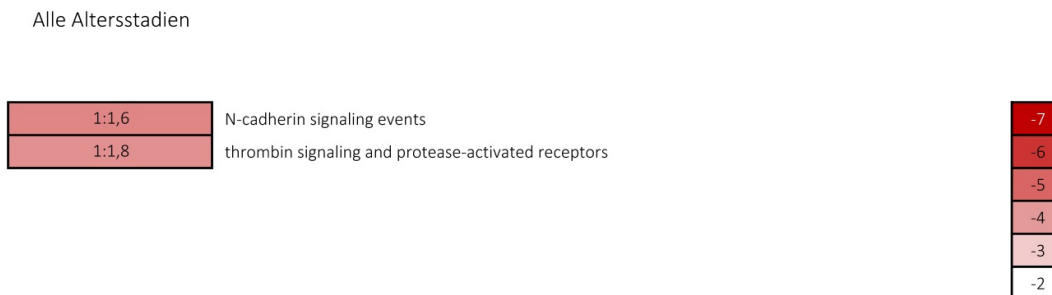
1. AKT(PKB)-BAD SIGNALING (IL-7 SIGNALING(JAK1 JAK3 STAT5))
2. AKT(PKB)-BAD SIGNALING (EPO SIGNALING PATHWAY(JAK2 STAT1 STAT3 STAT5))
3. GENE EXPRESSION (VEGF SIGNALING PATHWAY)
4. EGF SIGNALING PATHWAY
5. N-CADHERIN SIGNALING EVENTS

Auch bei der Analyse jener Gene, die in allen Entwicklungsgruppen grundsätzlich herauf- oder herabreguliert waren (siehe Kapitel 4.1.3), wurde der Signalweg „*n-cadherin signaling events*“ detektiert (Tab. 4.3; $p = 5,5 \cdot 10^{-5}$). Somit wiesen alle untersuchten Entwicklungsstadien eine gegenüber der adulten Kontrollgruppe gesteigerte Dynamik der Expression von Genen im HVC auf, die eine Rolle für die Entwicklung und Differenzierung neu geborener Zellen spielen. Dies schien einerseits wahrscheinlich Endothelzellen im Rahmen der Differenzierung des Blutgefäßsystems im HVC zu betreffen (siehe „*VEGF signaling pathway*“), und andererseits möglicherweise Neurone. So haben Untersuchungen bei adulten Kanarienvogel gezeigt, dass

CDH1, die Neuronen spezifische Variante dieser Genklasse, bei der Einwanderung neuer Neurone involviert ist (Barami et al., 1994).

Zwei der stark überrepräsentierten Signalwege waren jeweils nur in einer der fünf Entwicklungsgruppen zu beobachten: „*Signaling events mediated by focal adhesion kinase*“ bei der Gruppe ENTW-25 und „*Insulin pathway*“ bei der Gruppe ENTW-100. „*Signaling events mediated by focal adhesion kinase*“ reguliert die Bildung von Zelladhäsionen, die Zellmigration, moduliert die Kommunikation zwischen Integrinen und Wachstumsfaktoren und verbindet die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett (Mitra et al., 2005). Sowohl bei „*Integrin signaling pathway*“, als auch bei „*Signaling by focal adhesion kinase*“ bildete die Tyrosinkinase „*v-Src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*“ (SRC) einen Knotenpunkt, welche ubiquitär eine Schlüsselrolle bei zahlreichen Signaltransduktionsketten einnimmt (Parsons & Parsons, 2004). Somit könnte die Zell-Zell/Matrix-Interaktion im HVC 25 Tage alter männlicher Zebrafinken insbesondere durch die Proteinkinase SRC reguliert worden sein. Der Signalweg „*Insulin pathway*“ war insbesondere im HVC 100 Tage alter männlicher Zebrafinken präsent, obwohl Expressionsveränderungen der mit Stoffwechselvorgängen assoziierten Gene in alle Entwicklungsstadien auffällig waren (siehe Kapitel 4.1.5).

Tab. 4.3. Signalwege durch die sich alle Entwicklungsgruppen von den adulten Kontrolltieren unterschieden ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert dargestellt. Zudem ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalweges angegeben.



Die Analyse jener 1660 Gene, die in allen Entwicklungsgruppen gleichförmig herauf oder herabreguliert waren (Tab. 4.3b und c), erbrachte neben dem Cadherin Signalweg auch „*Thrombin signaling and protease-activated receptor*“. „*Thrombin*“ (PT) ist eine extrazelluläre Protease, die im Gehirn die Neurotransmission moduliert, indem sie die Langzeit Potenzierung und somit die Differenzierung synaptischer Verbindungen beeinflusst (Maggio et al., 2008; Mannaioni et al., 2008). Beide Prozesse sind Teil der physiologischen Grundlage für Lernen nach dem Hebb'schen Prinzip (Hebb, 1949; Whitlock et al., 2006).

4.1.4.3. Vergleich kanonischer Signalwege ähnlicher Entwicklungsgruppen

Die korrelative Analyse (Abb. 4.1) wies auf eine deutlich stärkere Ähnlichkeit zwischen den Gruppenpaaren ENTW-25 und ENTW-30 bzw. ENTW-50 und ENTW-100 hin, als sie zwischen den übrigen Entwicklungsgruppen beobachtet werden konnte. Neben den allen Entwicklungsstadien gemeinsamen Signalwegen war der „*Platelet amyloid precursor protein pathway*“ bei den Gruppen ENTW-25 und -30 (Tab. 4.4) bzw. der „*FAS signaling pathway*“ bei den beiden ältesten Entwicklungsgruppen (Tab. 4.5) gegenüber den Kontrollvögeln stark überrepräsentiert. „*Amyloid beta precursor protein*“ (APP) moduliert die Synaptogenese in Zellen des Maushippocampus in vitro (Priller et al., 2006). In *knock-out*-Mausmutanten (APP^(-/-)) kann eine erhöhte Frequenz exzitatorischer postsynaptischer Potentiale nachgewiesen werden, was sich in Morris-Wasserlabyrinth-Versuchen negativ auf ihre Lernfähigkeit auswirkt (Senechal et al., 2008). „*Fas cell surface death receptor*“ (FAS oder CD95) ist ein Mitglied der Tumornekroserezeptorfamilie und reguliert den programmierten Zelltod durch die Aktivierung von Caspasen (Van Herreweghe et al., 2010). Ein Modell zur Gesangsentwicklung besagt, dass eine anfangs erzielte Überproduktion an Gesangsvariabilität durch ein gezieltes Ausdünnen nicht benötigter Strukturen und Verbindungen geschieht. Hierfür könnte die apoptotische Funktion des Signalwegs „*FAS signaling pathway*“ von Bedeutung sein. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte damit die Ähnlichkeiten beider Gruppenpaare auch auf der Wirkung von Signalwegen beruhen, die im HVC in unterschiedlicher Weise das Gesangslernen beeinflussen.

Tab. 4.4. Kanonische Signalwege durch die sich die Entwicklungsgruppen ENTW-25 und ENTW-30 von den adulten Kontrolltieren unterscheiden ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$). Der Vollständigkeit wegen sind auch die bereits detektierten Signalwege (schraffiert) angeführt. Das Signifikanzniveau (\log_{10}), mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt.

ENTW-25	ENTW-30		
1:8,8		AKT(PKB)-BAD-SIGNALING (IL-7 SIGNALING (JAK1-JAK3-STAT5))	-7
1:6,7		AKT(PKB)-BAD-SIGNALING (ERO-SIGNALING PATHWAY (JAK2-STAT1-STAT3-STAT5))	-6
1:6,8		GENE EXPRESSION (VEGF SIGNALING PATHWAY)	-5
1:4,0		PLATELET AMYLOID PRECURSOR PROTEIN PATHWAY	-4
			-3
			-2

Tab. 4.5. Kanonische Signalwege durch die sich die Entwicklungsgruppen ENTW-50 und ENTW-100 von den adulten Kontrolltieren unterscheiden ($p < 1 \cdot 10^{-4}$). Der Vollständigkeit wegen sind auch die bereits detektierten Signalwege (schraffiert) angeführt. Das Signifikanzniveau (\log_{10}), mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt.

ENTW-50	ENTW-100		
1:1,0		FAS SIGNALING PATHWAY (CD95)	-7
1:5,3		AKT(PKB)-BAD-SIGNALING (IL-7 SIGNALING(JAK1/JAK3/STAT5))	-6
1:5,3		AKT(PKB)-BAD-SIGNALING (EPO-SIGNALING PATHWAY(JAK2/STAT1/STAT3/STAT5))	-5
1:5,3		GENE EXPRESSION (VEGF SIGNALING PATHWAY)	-4
			-3
			-2

4.1.5. Biologische Prozesse der Entwicklungsgruppen

Analog zur Analyse der kanonischen Signalwege wurden die Genlisten der Entwicklungsstadien mit jener der adulten Kontrollgruppe hinsichtlich der regulierten biologischen Prozesse untersucht. Diese Ergebnisse ermöglichen den Vergleich der Entwicklungsstadien untereinander. Aussagen über die Stimulation oder Hemmung eines biologischen Prozesses waren in der Regel nicht möglich, da stets eine Vielzahl von Genen mit einem biologischen Prozess assoziiert waren, und weder ihre Wirkung auf den biologischen Prozess beim Zebrafinken im Einzelnen noch im Zusammenhang mit allen übrigen Genen bekannt war.

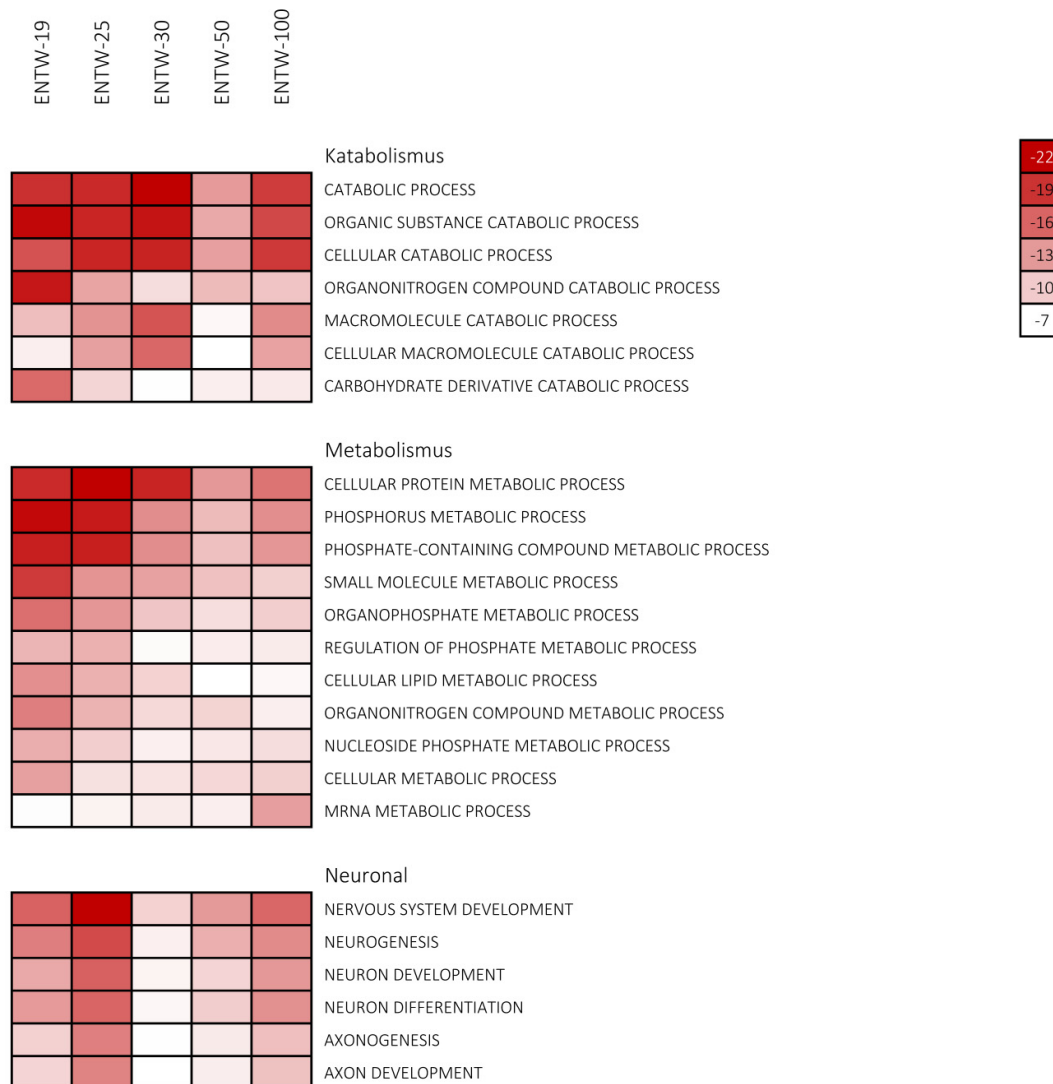
Insgesamt konnten im HVC 1329 biologische Prozesse detektiert werden, die in mindestens einer der fünf Entwicklungsgruppen signifikant überrepräsentiert waren ($p < 1 \cdot 10^{-2}$). Die Gruppen ENTW-19 ($n=781$) und ENTW-25 ($n=862$) enthielten die größte Anzahl, jedoch unterschied sich auch die älteste Entwicklungsgruppe mit 100 Tage alten Vögeln deutlich von den adulten Kontrollen (Tab. 4.6) (für eine Liste aller biologischen Prozesse siehe Anhang). Dies war insofern überraschend, da angenommen wird, dass die morphologische Entwicklung des HVC und die Gesangsentwicklung in diesem Alter bereits abgeschlossen sind. Am wahrscheinlichsten hatten die Veränderungen der Genexpression in allen Entwicklungsgruppen einen Einfluss auf die Organisation und den Stoffwechsel der Zellen. Dabei schien insbesondere der metabolische Stoffwechsel gegenüber der adulten Kontrolle stimuliert zu sein, da nur bei denjenigen Genen, die den „*Metabolic process*“ definieren, mehr Gene herauf- als herabreguliert waren. Als explizit neuronale Prozesse waren „*Neurogenesis*“ und „*Neuron development*“ in allen Gruppen vertreten, wobei mit der geringsten Signifikanz in der Gruppe ENTW-30.

Tab. 4.6. Biologische Prozesse, die im HVC der fünf Entwicklungsgruppen relativ zu den Adulten signifikant überrepräsentiert waren. Angegeben ist deren Anzahl ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) und für hoch signifikant veränderte Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-10}$) eine Spezifizierung, wobei redundante Nennungen aus der mittels GePS (Genomatix) ermittelten Liste entfernt wurden. Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Je geringer der p-Wert ausfällt, desto stärker ist die Ähnlichkeit zu den adulten Kontrolltieren. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalweges angegeben.

ENTW-19	ENTW-25	ENTW-30	ENTW-50	ENTW-100		
1:1,4	1:2,5	1:1,6	1:1,9	1:2,1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-35
1:1,7	1:2,1	1:2,1	1:2,4	1:2,2	LOCALIZATION	-29
1:1,8	1:3,2	1:3,2	1:3,2	1:2,0	TRANSPORT	-23
1:1,8	1:3,1	1:6,5	1:3,6	1:2,3	PROTEIN MODIFICATION PROCESS	-17
1:1,5	1:4,6	1:4,4	1:3,0	1:1,9	ORGANELLE ORGANIZATION	-11
1:1,8	1:4,7	1:4,5	1:2,9	1:1,7	ESTABLISHMENT OF LOCALIZATION IN CELL	-5
1:1,3	1:3,5	1:3,5	1:4,4	1:3,0	NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	
1:1,8	1:5,2	1:2,7	1:3,1	1:1,8	CATABOLIC PROCESS	
1:0,8	1:0,9	1:0,8	1:0,8	1:0,7	METABOLIC PROCESS	
1:1,1	1:3,3	1:3,0	1:3,3	1:2,6	CELL PROJECTION ORGANIZATION	
1:1,4	1:1,7	1:2,0	1:2,7	1:2,8	DEVELOPMENTAL PROCESS	
1:1,9	1:4,8	1:4,3	1:2,4	1:1,4	INTRACELLULAR TRANSPORT	
1:1,4	1:1,9	1:2,3	1:3,2	1:2,9	ANATOMICAL STRUCTURE DEVELOPMENT	
1:1,2	1:3,4		1:4,4	1:3,0	NEUROGENESIS	
1:1,1	1:3,3	1:2,8	1:3,9	1:3,1	NEURON DEVELOPMENT	
1:1,7	1:4,5	1:4,8	1:3,3	1:2,0	PHOSPHORUS METABOLIC PROCESS	
1:1,2	1:4,1	1:3,5	1:4,5	1:3,2	TRANSMEMBRANE RECEPTOR PROTEIN TYROSINE KINASE SIGNALING PATHWAY	
1:1,8	1:5,3	1:5,0		1:1,7	MACROMOLECULE LOCALIZATION	
1:1,5	1:4,8	1:4,8	1:4,2	1:2,4	PHOSPHORYLATION	
1:2,0	1:4,9	1:5,5	1:3,4	1:2,0	SMALL MOLECULE METABOLIC PROCESS	
781	862	560	605	631	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-2}$)	

Für eine spezifischere Analyse altersabhängiger Effekte wurden als nächstes die biologischen Prozesse ohne jene 1660 Gene ermittelt, durch welche sich alle Entwicklungsgruppen von den Adulten unterschieden (Tab. 4.7). Auf der Basis dieser Daten trat der zeitliche Verlauf einiger Prozesse zu Tage. Metabolische Prozesse von phosphorhaltigen Substanzen, Proteinen und Lipiden waren bei den beiden jüngsten Gruppen deutlicher als in den älteren Gruppen vertreten. Katabolische Prozesse hatten in der Gruppe ENTW-50 ein lokales Signifikanzminimum.

Tab. 4.7. Katabolische, metabolische und neuronale Prozesse, die in den verschiedenen Entwicklungsgruppen ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$) durch solche Gene überrepräsentiert wurden, die nicht in allen Gruppen signifikant von den Adulten verschieden waren. Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Auf die Nennung der Verhältniszahlen wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Sie entsprachen weitestgehend jenen Werten, die bereits zuvor (Tab. 4.6) ermittelt werden konnten.



Neuronale Prozesse, wie Neurogenese und Axogenese, hatten in der Gruppe ENTW-25 ein lokales Signifikanzmaximum, und waren nach geringerer Signifikanz in den Gruppen ENTW-30 und ENTW-50 wieder stärker in der Gruppe ENTW-100 vertreten. Da erstens im juvenilen HVC die Neurogenese (Nordeen & Nordeen, 1988; Pytte et al., 2007) und das axonale Wachstum der Projektionsneurone stärker ausgeprägt ist als im adulten (Mooney & Rao, 1994), und

zweitens im juvenilen HVC die Mehrzahl der mit den Prozessen Neurogenese bzw. Axonogenese assoziierten Gene dem adulten HVC gegenüber herabreguliert war, könnte der Entwicklungsverlauf des Genexpressionsmusters auf eine Enthemmung beider Prozesse insbesondere bei der Gruppe ENTW-25 hindeuten. Insgesamt ergab die Analyse der biologischen Prozesse keine Ähnlichkeit der Gruppen ENTW-25/ENTW-30, wie sie für die kanonischen Signalwege nachgewiesen werden konnte.

Tab. 4.8b. Liste der zehn am stärksten relativ zu den Adulten herauf- und herabregulierten Gene für ENTW-25.

ENTW-25

Gensymbol	Expression	Gennamen
CENPE	4,17	centromere protein E, 312kDa
TMEM233	3,25	transmembrane protein 233
MYLK4	3,2	myosin light chain kinase family, member 4
DUOXA2	2,99	dual oxidase maturation factor 2
FARP1	2,97	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein
OPN4	2,89	opsin 4
PMP2	2,73	peripheral myelin protein 2
POLN	2,71	polymerase (DNA directed) nu
DCX	2,69	doublecortin
COMMD1	2,66	copper metabolism (Murr1) domain containing 1

[illegible]

Herabreguliert

TPH1	0,37	tryptophan hydroxylase 1
CTSC	0,37	cathepsin C
MOSPD2	0,37	motile sperm domain containing 2
CD82	0,36	CD82 molecule
SYT2	0,35	synaptotagmin II
CALHM3	0,35	calcium homeostasis modulator 3
NME1	0,34	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1
GUK1	0,33	guanylate kinase 1
GPHN	0,25	gephyrin
APOH	0,24	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)

Tab. 4.8c. Liste der zehn am stärksten relativ zu den Adulten herauf- und herabregulierten Gene für ENTW-30.

[illegible]

Tab. 4.8d. Liste der zehn am stärksten relativ zu den Adulten herauf- und herabregulierten Gene für ENTW-50.

ENTW-50

Gensymbol	Expression	Genname
Heraufreguliert		
DUOXA2	4,69	dual oxidase maturation factor 2
TMEM233	3,71	transmembrane protein 233
TRDN	3,71	triadin
TMBIM4	3,27	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4
ZFC3H1	2,81	zinc finger, C3H1-type containing
PLEKHA5	2,68	pleckstrin homology domain containing, family A member 5
STRADB	2,68	STE20-related kinase adaptor beta
RG9MTD2	2,66	TRNA Methyltransferase 10 Homolog
GORASP2	2,64	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa
C14orf68	2,64	solute carrier family 25, member 47

[illegible]

Herabreguliert

TINAG	0,37	tubulointerstitial nephritis antigen
DPYSL2	0,36	dihydropyrimidinase-like 2
SGMS2	0,36	sphingomyelin synthase 2
SPRR1B	0,36	small proline-rich protein 1B
WNT8A	0,35	wingless-type MMTV integration site family, member 8A
MKS1	0,34	Meckel syndrome, type 1
LRRC32	0,33	leucine rich repeat containing 32
GMFB	0,29	glia maturation factor, beta
CEP110	0,28	centriolin
SERINC3	0,28	serine incorporator 3

Tab. 4.8e. Liste der zehn am stärksten relativ zu den Adulten herauf- und herabregulierten Gene für ENTW-100.

[illegible]

Heraufregulierte Gene

In den Listen mit den jeweils zehn am stärksten regulierten Genen ließ sich für jede Entwicklungsgruppe mindestens eines finden, das nur in dieser Gruppe und um mehr als das dreifache heraufreguliert wurde: ENTW-19 (*IFI6*, „Interferon, alpha-inducible protein 6“), -25 (*CENPE*, „Centromere protein E, 312kDa“), -30 (*GATM*, „Glycine amidinotransferase“; *NKTR*, „Natural killer cell triggering receptor“; *ODF2L*, „Outer dense fiber of sperm tails 2-like“), -50 (*TMBIM4*; „Transmembrane BAX inhibitor motif containing 4“) und -100 (*KIAA1644*). Für die Gruppe ENTW-50 ergab sich mit *TMBIM4* (Reimers et al., 2008) neben der Überrepräsentation des „FAS signaling pathway“ (Tab. 4.5) ein zweiter Hinweis auf eine wichtige Rolle der Apoptose im HVC dieses Altersstadiums.

Nur in den beiden jüngsten Gruppen (ENTW-19 und -25) war die Expression der Gene „*Doublecortin*“ (*DCX*) und „*Melanopsin*“ (*OPN4*) stark erhöht. *DCX* gibt einen Hinweis auf verstärkte Neurogenese in der Phase von 19 bis 25 Tagen nach dem Schlupf. Dieses Gen codiert für ein microtubuliassoziiertes Protein und wird am Beginn der Zellteilung in neuronalen Stammzellen produziert. Da die gebildete Tochterzelle das Protein weitere zwei bis drei Wochen exprimiert, wird *DCX* als Marker für Neurogenese verwendet. Das Telencephalon, wie auch die Gesangskerne HVC und RA, zeigen geschlechtsunabhängig eine deutlich höhere *DCX*-Expression bei juvenilen als bei adulten Zebrafinken (Kim et al., 2006). Zudem ist bei adulten Zebrafinken ist eine höhere *DCX*-Expression in Zellen der Ventrikelwand als im umgebenden Parenchym beschrieben (Kim et al. 2006). Allerdings zeigen neuere Studien am adulten Kanarienvogel, dass *DCX* nicht als hinreichender Indikator für Neurogenese gelten kann (Vellema et al., 2014). *OPN4* codiert für ein Photopigment, welches zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt wird. Entdeckt wurde *OPN4* in Hautzellen des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) (Provencio et al., 1998). Hauptsächlich exprimiert wird *OPN4* in intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglionzellen (Yamazaki et al., 2002), sowie im „*Suprachiasmatischen nucleus*“ (SCN). Dort fungiert *OPN4* als Detektor in der nicht visuellen okularen Photorezeption (Provencio et al., 1998; Gooley et al., 2003; Sexton et al., 2012). Somit könnte er auch im HVC in der Gesangssteuerung involviert sein. Hierzu bedarf es jedoch weiterer Analysen.

Während der frühen sensomotorischen Phase des Gesangslernens, in den Gruppen ENTW-25 und -30, waren im HVC die Gene „*Dual oxidase maturation factor 2*“ (*DUOX2*) und „*Copper metabolism (Murr1) domain containing 1*“ (*COMMD1*) stark heraufreguliert. Beim Produkt des Gens *DUOX2* handelt es sich um einen Transporter, welcher indirekt an der Produktion von Thyroidhormonen beteiligt ist. *DUOX2* wird für die Reifung und den Transport des Enzyms „*Dual oxidase 2*“ (*DUOX2*) zum Endoplasmatischen Retikulum benötigt, welches dort für die Thyroidhormonsynthese benötigt wird (Grasberger & Refetoff, 2006) und die Verarbeitung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) involviert ist (Lipinski et al., 2009; MacFie et al., 2014). *COMMD1* codiert für ein Protein, das organabhängig zahlreiche Prozesse steuert. So reguliert *COMMD1* das Kupfer-Gleichgewicht, die Aufnahme von Natrium, die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors „*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“ (*NF-κB*) (Maine et al., 2007; Bartuzi et al., 2013) und die Funktion des NMDA Rezeptors (Baecker et al., 2014).

Die beiden ältesten Gruppen (ENTW-50 und -100) zeichneten sich durch eine starke Heraufregulation des Gens „*Triadin*“ (*TRDN*) aus. *TRDN* bildet Strukturen mit dem „*Ryanodin-rezeptor 3*“ (*RYR3*), welcher ebenso nur in den beiden ältesten Gruppen heraufreguliert wurde, und reguliert die Ca^{2+} - Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen bzw. Endoplasmatischen Retikulum (Li et al., 2011; Jakob et al., 2014).

Mit „*Transmembran Protein 233*“ (*TMEM233*) wurde ein Gen detektiert, das in allen Entwicklungsgruppen, besonders stark jedoch in den vier jüngeren Gruppen reguliert wurde (Tab. 4.8). *TMEM233* wird zur kürzlich entdeckten Gruppe der evolutiv hochkonservierten Dispaninen gezählt und ist an Entwicklungsprozessen beteiligt (Sällman Almén et al., 2012).

Herabregulierte Gene

Im Gegensatz zu den heraufregulierten Genen war die Mehrzahl der mindestens um den Faktor drei herabregulierten Gene spezifisch für die entsprechende Entwicklungsgruppe (Tab. 4.8a-e). So ist das Gen „*Proteolipid protein 1*“ (*PLP1*) in der Gruppe ENTW-19 stark herabreguliert, aber auch in den folgenden zwei Altersstadien relativ gering exprimiert, gleicht in der Expressionsstärke bei ENTW-50 der Kontrollgruppe und zeigt bei ENTW-100 ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau. Es handelt sich bei *PLP1* um ein Transmembranprotein, dessen Mutation zur Ausprägung der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit führt, einer schweren Erkrankung des zentralen Nervensystems, das auf eine gestörte Ausbildung der Myelinscheiden zurückgeführt wird. In diesem Kontext ist *PLP1* an der Entwicklung von Oligodendrozyten beteiligt ist und beeinflusst das Überleben von Axonen (für Übersichtsartikel: de Monasterio-Schrader et al. 2012; Morrison et al. 2013). Als weiteres Beispiel soll das Gen „*Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1*“ (*NETO1*) dienen, das bei ENTW-19 stark herabreguliert war (Tab. 8a), ebenfalls bei ENTW-25 signifikant herabreguliert war, und bei den späteren Gruppen das Expressionsniveau der Adulten erreichen. *NETO1* zählt zu den Transmembranproteinen und spielt bei der Entwicklung neuronaler Netzwerke eine essentielle Rolle, indem es mit Glutamatrezeptoren des NMDA- und Kainat-Typs interagiert (Tomita & Castillo, 2012; Cousins et al., 2013).

In den beiden frühen Gruppen ENTW-19 und -25 war „*Synaptotagmin*“ (*SYT2*) stark herabreguliert, zeigte jedoch eine allmähliche Angleichung an das Expressionsniveau der adulten Kontrolltiere. Die Klasse der calciumsensitiven Synaptotagmine regulieren die Exozytose von Neurotransmittervesikeln (Young & Neher, 2009; Kochubey et al., 2011). Aufgrund dieser Funktion könnte *SYT2* im Zusammenhang mit der graduellen Zunahme des stereotypen Feuermusters der HVC- und nachgeschalteten RA-Neurone stehen, die im Zuge der Gesangsentwicklung zu beobachten ist (Adret & Margoliash, 2002).

Bei den beiden Gruppen ENTW-25 und -30 wurde eine starke Herabregulation des Gens für „*Apolipoprotein H*“ (*APO-H*) beobachtet. Das Gen „*Glia maturation factor beta*“ (*GMFB*) war zunächst heraufreguliert (ENTW-19 und ENTW-25), wurde dann aber signifikant herabreguliert. Dies geschah verstärkt in den Gruppen ENTW-50 und -100. *GMFB* wird in weiten Teilen des Zentralen Nervensystems der Maus entwicklungsunabhängig exprimiert und steuert die Reifung und Differenzierung von Neuronen und Gliazellen (Inagaki et al., 2004).

4.1.7. Neurotransmitterrezeptoren codierende Gene in den Entwicklungsgruppen

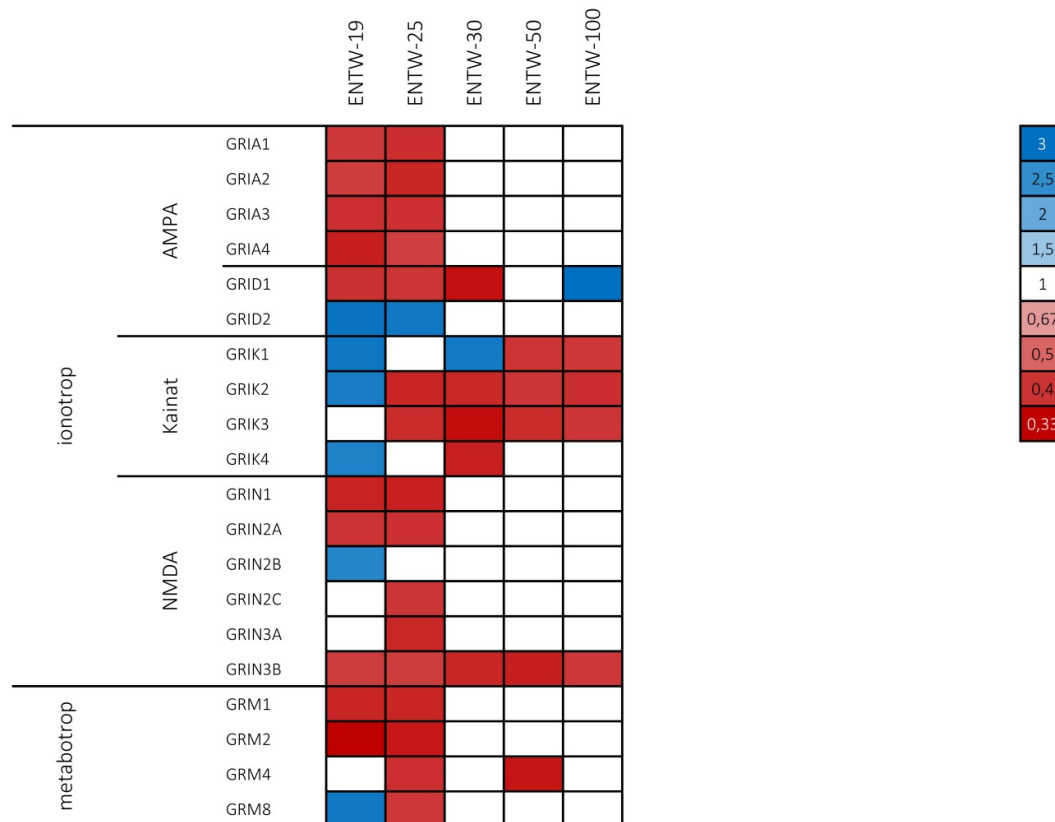
Die Hauptfunktion des HVC für die Gesangsproduktion besteht in der zeitlichen Steuerung der Abfolge der Gesangssilben (Long & Fee, 2008; Andelman et al., 2011). Im Zuge der sensomotorischen Phase und auch noch darüber hinaus erhöht sich der Grad der Stereotypie des Gesangs (Pytte et al., 2007). Dieser Verarbeitungsprozess setzt eine Anpassung der Neurotransmission voraus (Luján et al., 2005), welche sich im Nagergehirn durch Veränderungen in der entwicklungsabhängigen Zusammensetzung der Neurotransmitterrezeptoren aus den entsprechenden Untereinheiten äußert (Massey et al., 2004; Cui et al., 2013). Inwieweit sich das Expressionsmuster der Rezeptoruntereinheiten in den Entwicklungsgruppen unterschied wird im Folgenden gezeigt.

4.1.7.1. Glutamaterezeptoren

Eines der grundlegenden Paradigmen zur Entwicklung einer kritischer Phasen besagt, dass die erhöhte Plastizität durch die Veränderung in der synaptischen Konnektivität ausgelöst wird, wobei hauptsächlich Glutamaterezeptoren an diesen Prozessen beteiligt sind (Goodman & Shatz, 1993). Daher wurde die Expression der Glutamaterezeptoren detaillierter analysiert. Glutamaterezeptoren setzen sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, deren Expression entwicklungsabhängig und gewebespezifisch ist (Luján et al., 2005). Veränderungen in der Zusammensetzung können die Rezeptorphysiologie, sowie die nachgeschalteten Signaltransduktionsketten grundlegend verändern (Takahashi et al., 1996; Furukawa et al., 2005). Auf entwicklungspezifische Veränderungen im Expressionsmuster der Untereinheiten verschiedener Glutamaterezeptortypen wird im Folgenden eingegangen (Tab. 4.9).

Alle Untereinheiten der alpha-Familie ionotroper α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA) - Rezeptoren waren in den ersten beiden untersuchten Altersstadien ENTW-19 und ENTW-25 signifikant herabreguliert, und zeigten bereits während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens das adulte Expressionsniveau. Ein ähnliches Bild relativ geringer Expression in frühen Stadien und adulte Expressionslevel während der Gesangsentwicklung ergab sich für die Expression der meisten Untereinheiten der N-methyl-D-aspartat (NMDA) und metabotropen Glutamaterezeptoren (Tab. 4.9). *GRIN3B* hingegen, das für eine verringerte Ca^{2+} Permeabilität der NMDA Rezeptoren sorgt (Matsuda et al., 2002; 2003), war bei allen fünf Entwicklungsgruppen signifikant herabreguliert. Für die ionotropen Glutamaterezeptoruntereinheiten des Kainat-Typs zeigte sich im Vergleich mit den AMPA- und NMDA-Rezeptoren ein eher gegenläufiges Bild. Drei der vier detektierten Subtypen des Kainatrezeptors waren vor Beginn der sensorischen Phase signifikant heraufreguliert und nach ENTW-50, bzw. ENTW-30 für *GRIK1*, signifikant herabreguliert. Auch für die Untereinheiten des metabotropen Glutamaterezeptors folgten größtenteils dem bereits für AMPA und NMDA-Rezeptoren beschriebenen Entwicklungsprofil.

Tab. 4.9. Expression der Glutamaterezeptoren im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung relativ zu den Adults. Farblich codiert ist die relative faktorielle Expressionsveränderung gegenüber der adulten Kontrollgruppe (blau = heraufreguliert; rot = herabreguliert).



4.1.7.2. GABA- und Glycinrezeptoren

Im HVC lassen sich verschiedene Typen lokaler hemmender Interneurone nachweisen (Grisham & Arnold, 1994; Dutar et al., 1998; Kubota & Taniguchi, 1998; Hahnloser et al., 2002; Wild et al., 2005; Pinaud & Mello, 2007). Die inhibitorische Neurotransmission beeinflusst im HVC das zeitliche Muster der neuronalen Aktivität (Solis & Perkel, 2005) und spielt eine essentielle Rolle für die Interaktion von Projektionsneuronen nach einem Gesang (Schmidt & Perkel, 1998; Mooney & Prather, 2005; Rosen & Mooney, 2006). So könnte die gesangsinduzierte Hemmung Area X-projezierender Zellen, die von RA-projezierenden Neuronen ausgeht (Hahnloser et al., 2002) und über lokale Interneurone vermittelt wird (Mooney & Prather, 2005; Rosen & Mooney, 2006), zur Differenzierung dieser Zellen in auditorische-vokale Spiegelneurone beitragen (Prather et al., 2008).

GABA (*γ-Aminobutyric acid*) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter im gereiften Zentralen Nervensystem (für Übersichtsartikel siehe: Wu & Sun, 2014). Im HVC tragen GABAB-Rezeptoren und über metabotrope Glutamatrezeptoren aktivierte GIRK-Kanäle zur Entstehung langsamer inhibitorischer postsynaptischer Potentiale bei (Schmidt & Perkel, 1998; Dutar et al., 2000; Rosen & Mooney, 2003). Für einige GABA-Rezeptoren fand sich ein entwicklungsabhängiges Expressionsschema, wie es bei der Mehrzahl der Glutamatrezeptoren auftrat (Tab. 4.10). So war die Expression von *GABRE* (GABAA-Rezeptor gamma 4), *GABRG1* und 2, *GABRP* und *GABRR3* zunächst (ENTW-19 und ENTW-25) relativ zu den Kontrolltieren herabreguliert, glich aber bereits während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens dem höheren Expressionsniveau adulter Zebrafinken (Tab. 4.10). Eine derartige entwicklungsabhängige Heraufregulation wurde für *GABRE* bereits beschrieben (Thode et al., 2008).

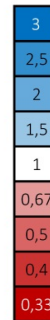
Im Gegensatz zu dieser Gruppe von GABA-Rezeptoren veränderte sich das Expressionsmuster der Mehrzahl der detektierten GABAA- und der beiden GABAB-Rezeptoren auch in den älteren Entwicklungsgruppen. So war der im Säugerhirn extrasynaptische GABA-Rezeptor A5 im HVC aller Entwicklungsgruppen gegenüber den adulten Kontrolltieren heraufreguliert (Tab. 4.10) und zeigte damit einen entwicklungsabhängigen Verlauf des Expressionsniveaus im HVC, der seinem Expressionstrend im Mäusegehirn entspricht (Yu et al., 2006). Insgesamt wiesen die relativ späten Expressionsveränderungen der GABAA- und GABAB-Rezeptoren im HVC des Zebrafinken auf eine Parallele zur späten Reifung des GABA-ergen Systems im Säugetiergehirn hin (Kilb, 2012). Untersuchungen zur Rolle bei der Bildung von Gedächtnisinhalten und neuronalen Netzwerken, wie sie bei Mäusen für den *GABRA5* (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002) und die GABAB-Rezeptoren (Gaiarsa & Porcher, 2013; für Übersichtsartikel siehe: Gassmann & Bettler, 2012) durchgeführt wurden, liegen für Zebrafinken nicht vor.

Ergänzend zur Expression der Rezeptoren konnte ein Anstieg der Expression des Enzyms „*Glutamat decarboxylase*“ (*GAD1*) ab ENTW-30 auf das Niveau der adulten Tiere festgestellt werden. *GAD1* katalysiert den finalen Schritt in der GABA-Synthese und ist limitierend für seine synaptische Verfügbarkeit (Pinal & Tobin, 1998).

Drei der vier detektierten Glycinrezeptorsubtypen waren in allen fünf Entwicklungsstadien signifikant herabreguliert (Tab. 4.10), *GLRA2* hingegen nur bei ENTW-25. Über die Funktion dieses Neurotransmittersystems im Vogelhirn ist bislang nichts bekannt. Im Säugerhirn wirkt Glycin im adulten Nervensystem exzitatorisch, während der Entwicklung jedoch inhibitorisch (Reichling et al., 1994).

Tab. 4.10. Expression der GABA- und Glycinrezeptoren im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung relativ zu den Adults. Farblich codiert ist die relative faktorielle Expressionsveränderung gegenüber der adulten Kontrollgruppe (blau = heraufreguliert; rot = herabreguliert).

		ENTW-19	ENTW-25	ENTW-30	ENTW-50	ENTW-100
GABA	GABRA2	rot	rot	rot	weiß	blau
	GABRA3	blau	weiß	weiß	rot	rot
	GABRA5	blau	blau	blau	blau	blau
	GABRA6	weiß	rot	rot	weiß	weiß
	GABRB1	rot	rot	rot	rot	rot
	GABRB2	rot	rot	rot	weiß	blau
	GABRD	rot	rot	rot	weiß	blau
	GABRE	rot	rot	rot	weiß	weiß
	GABRG1	rot	weiß	weiß	rot	weiß
	GABRG2	weiß	rot	weiß	weiß	weiß
	GABRG3	blau	blau	weiß	weiß	weiß
	GABRP	rot	rot	weiß	weiß	weiß
	GABRQ	weiß	weiß	blau	weiß	weiß
	GABRR1	rot	rot	rot	rot	rot
	GABRR2	rot	rot	weiß	weiß	blau
	GABRR3	rot	rot	weiß	weiß	weiß
Glycin	GLRA1	weiß	rot	weiß	weiß	weiß
	GLRA2	rot	rot	rot	rot	rot
	GLRA3	rot	rot	rot	rot	blau
	GLRA4	rot	rot	rot	rot	rot



4.1.7.3. Acetylcholinrezeptoren

Der HVC wird von cholinergen Fasern aus dem ventralen Paleostriatum innerviert (Ryan & Arnold, 1981; Li & Sakaguchi, 1997; Sakaguchi et al., 2000). Nikotinische wie muskarinerge Eingänge spielen dabei eine wichtige Rolle beim Gesangslernen, in dem sie die Verarbeitung von auditorischen Eingängen modulieren (Shea & Margoliash, 2003), da sie einen Einfluss auf die Interaktion der RA- und Area X projizierenden Neurone haben (Shea et al., 2010). Obwohl ein Nachweis für die Expression nikotinischer Acetylcholinrezeptoren im adulten Zebrafinken bereits Ende der 1980er Jahre erbracht wurde (Watson et al., 1988), ist über das Expressionsmuster der Acetylcholinrezeptoren im HVC während der hier untersuchten Entwicklungsphasen nichts bekannt. Allerdings nimmt im HVC die Konzentration von Acetylcholin (Sakaguchi & Saito, 1989)

und Cholinacetyltransferase (Sakaguchi & Saito, 1991) während des Gesangslernens zu und danach wieder ab.

Im Gegensatz zu den Glutamatrezeptoren war für die Acetylcholinrezeptoren ein heterogenes Expressionsmuster zu erkennen (Tab. 4.11). Während des Gesangslernens zeigten drei nikotinische Untereinheiten ein bemerkenswertes Expressionsmuster. Allein in der sensorischen (ENTW-25) bzw. sensomotorischen (ENTW-50) Phase waren die Gene *CHRNA2* bzw. *CHRNA4* im juvenilen HVC geringer exprimiert als bei den adulten Kontrolltieren. Mutationen dieser Acetylcholinrezeptoren sind bei Säugetieren mit Defiziten bei der Gedächtnisbildung assoziiert (Bertrand et al., 2005; Cho et al., 2008; Semenova et al., 2012). Das Gen *CHRNA7* zeigte eine veränderte Expression ausschließlich und während aller Phasen des Gesangslernens, wobei diese anfangs herab- und später heraufreguliert war. Auch bei diesem Acetylcholinrezeptor verursachen Mutationen kognitive Defizite (Wallace & Bertrand, 2013).

Tab. 4.11. Expression der Acetylcholinrezeptoren, unterteilt nach nikotinischem und muskarinischem (musk.) Subtyp, im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung relativ zu den Adulten. Farblich codiert ist die relative faktorielle Expressionsveränderung gegenüber der adulten Kontrollgruppe (blau = heraufreguliert; rot = herabreguliert, musk = muskarinisch).

		ENTW-19	ENTW-25	ENTW-30	ENTW-50	ENTW-100
cholinergisch	nikotinisch	CHRNA1	3		0,33	0,33
		CHRNA3				2,5
		CHRNA4	3		0,33	0,33
		CHRNA5				2,5
		CHRNA7	0,67	0,67	2	
		CHRNA9	3			
		CHRNA2		0,5		
		CHRNA4			0,4	
		CHRNA7		0,67	0,67	0,67
	musk.	CHRNA4		0,67	0,67	0,67
		CHRNA5	3	3		
		CHRNA7		0,67	0,67	0,67

4.1.7.4. Rezeptoren katecholaminerger Neurotransmitter

Im HVC lassen sich Fasern nachweisen, die immunoreaktiv für „*Tyrosinhydroxylase*“ (*TH*) sind (Bottjer, 1993), dem Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Biosynthese von Katecholaminen katalysiert. Diese Immunoreaktivität des HVC nimmt im Alter von 35 bis 60 Tagen zu und erreicht adultes Niveau wenn sich die sensorische Phase des Gesangslernens schließt (Soha et al., 1996).

Dopaminrezeptoren

Das dopaminerge System stellt ein weiteres neuromodulatorisches System dar. Es bewirkt weitreichende, entwicklungsabhängige Effekte auf die neuronale Aktivität, Genexpression. Zur Entwicklung der Dopaminkonzentration im HVC liegen widersprüchliche Beobachtungen vor (Sakaguchi & Saito, 1989; Harding et al., 1998). Allerdings scheint der Dopaminsatz im juvenilen HVC gegenüber adultem Gewebe erhöht (Harding et al., 1998). Im HVC adulter Zebrafinken wurden die Dopaminrezeptoren *DRD1A*, *1B* und *1D*, *DRD2* und *DRD3* bereits nachgewiesen (Kubikova et al., 2010).

Tab. 4.12. Expression aller detektierten Dopamin-, Serotonin- und Adrenalin- bzw. Noradrenalinrezeptoren im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung relativ zu den Adults. Farblich codiert ist die relative faktorielle Expressionsveränderung gegenüber der adulten Kontrollgruppe (blau = heraufreguliert; rot = herabreguliert).

		ENTW-19	ENTW-25	ENTW-30	ENTW-50	ENTW-100
Dopamin	DRD1	3	2,5	2	1,5	1
	DRD2	0,67	0,5	0,4	0,33	
	DRD3					
	DRD4					
	DRD5					
Serotonin	HTR1A					
	HTR2A					
	HTR2B					
	HTR2C					
	HTR3A					
	HTR4					
	HTR7					
Nor-/ Adrenalin	ADRA1B					
	ADRA1D					

Im HVC der Entwicklungsgruppen war die Expression des Rezeptors *DRD1* in fast allen Altersgruppen und die des Rezeptors *DRD3* in den beiden jüngsten Stadien erhöht (Tab. 4.12). Dieser Entwicklungsverlauf stimmte mit den Ergebnissen von Kubikova et al., (2010) überein. Dagegen konnte eine frühe Herabregulation der *DRD2* Expression nur hier gemessen werden. Interessanterweise beschrieb die Expression der beiden Rezeptorsubtypen *DRD2* und *DRD3* bei ENTW-19 und ENTW-25 eine gegenläufige Veränderung (Tab. 4.12). Wie *DRD1* in den meisten Gruppen heraufreguliert war, so fand sich für *DRD4* eine entsprechende Herabregulation. Das Expressionsmuster des Rezeptors *DRD5* unterschied sich von allen anderen Subtypen, in dem dieser Rezeptor nur in der Gruppe ENTW-50 reguliert wurde.

Serotoninrezeptoren

Serotonin spielt im Gehirn während der Entwicklung und beim Lernen eine Rolle (Harvey, 2003), indem es durch Interaktionen mit anderen Neurotransmittersystemen agiert (Eriksson et al. 2008; Elvander-Tottie et al. 2009; für Übersichtsartikel: Kranz et al. 2010; Seyedabadi et al. 2014). Bei keiner der hier detektierten Serotoninrezeptoruntereinheiten lag der Expressionslevel der Entwicklungsgruppen über dem der Kontrolltiere (Tab. 4.12). Dabei ließen sich zwei Expressionsmuster unterscheiden. Bei dem einen war die Expression der Rezeptoren im HVC in den ersten drei untersuchten Stadien signifikant herabreguliert und bei ENTW-50 und ENTW-100 nicht mehr von der bei adulten Vögeln zu unterscheiden (*HTR1A*, *HTR2A*, *HTR2B*, *HTR2C*). HTRs werden in zahlreichen Organen und Gehirnarealen unterschiedlich exprimiert. Wird *HTR2A* im visuellen Cortex von Makaken exprimiert, konnte es bei Nagern nicht nachgewiesen werden (Watakabe et al., 2009). Zudem scheint *HTR2A* eine wichtige Funktion beim assoziativen Lernen zu übernehmen (Williams et al., 2002; Harvey, 2003). Im RA adulter Zebrafinkenmännchen moduliert Serotonin via nicht näher definierter HTR2-Rezeptoren prämotorische Neurone, und verändert auf diese Weise die Grundfrequenz und die Tonhöhe des Gesangs (Wood et al. 2011; 2013). Ein anderes Expressionsmuster zeigten die Rezeptoren der Subtypen drei (*HTR3A*), vier (*HTR4*) und sieben (*HTR7*), die in fast allen Entwicklungsstadien herabreguliert waren.

Adrenalin- und Noradrenalinrezeptoren

Den HVC innervieren Fasern, die für Dopamin- β -hydroxylase (*DBH*), jenes Enzym das die Oxidation von Dopamin zu Adrenalin/Noradrenalin katalysiert, immunoreaktiv sind (Mello et al., 1998). Beim Zebrafinken ist der Noradrenalinumsatz im HVC während des Gesangslernens erhöht (Harding et al., 1998) und durch den Einsatz von Noradrenalin im HVC verändert sich dessen neuronale Aktivität und die auditorische Reizbarkeit des RA (Dave et al., 1998).

Im HVC der Entwicklungsgruppen ließen sich nur zwei adrenerge Rezeptoren detektieren (Tab. 4.12). Wie die serotonergen Rezeptoren waren auch diese während des Gesangslernens nicht heraufreguliert.

4.1.8. Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse der Entwicklungsstudie zur Genexpression im HVC männlicher Zebrafinken im Alter von 19 bis 100 Tagen, die im Verhältnis zu adulten Kontrolltieren ermittelt wurde, ließen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Zwischen dem 19-ten und 25-ten Tag trat die stärkste Veränderung des Expressionsmusters auf.
2. Veränderungen der Expression von Genen, die mit Neurogenese und Axonogenese in Verbindung stehen, konnten insbesondere bei den 25 Tage alten Vögeln detektiert werden.
3. Bei 50 und 100 Tage alten Vögeln war spezifisch auch der mit apoptotischen Effekten verbundene "*FAS signaling pathway*" reguliert.
4. Ab einem Alter von 25 Tagen wiesen die Vögel aller Entwicklungsgruppen Veränderungen der Expression von Genen auf, die eine Rolle bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems spielen.
5. Während die Expression der NMDA- und AMPA-, aber nicht der Kainat-Rezeptoren im Zuge des Gesangslernens adultes Niveau erlangt hatte, konnten für GABA-, acetylcholin- und katecholaminerge Rezeptoren auch in den bis zu 100 Tage alten Entwicklungsgruppen Unterschiede im Expressionslevel relativ zu adulten HVCs gemessen werden.

4.2. Östradiolstudie

Das Gesangssystem der Singvögel zeichnet sich durch eine sexualdimorphe Entwicklung aus, bei der Steroidhormone eine modifizierende Rolle zu spielen scheinen (Arnold et al., 1996; Arnold, 1997; Gahr & Metzdorf, 1999; Wade et al., 1999; Wade & Arnold, 2004; McCarthy & Arnold, 2011). Welche Funktion Geschlechtshormone bei der Entwicklung des männlichen HVC während des Gesangslernens ausüben, ist noch weitgehend unbekannt. So singen Zebrafinkenmännchen auch wenn ihnen bereits sieben bis neun Tage nach dem Schlupf die Gonaden entfernt wurden (Adkins-Regan & Ascenzi, 1990). Die Behandlung juveniler Zebrafinkenmännchen mit dem Aromataseinhibitor Fadrozol führt zu einer Verringerung des Neuronendurchmessers im adulten HVC, ohne dass Veränderungen im Gesangsverhalten festgestellt werden konnten (Merten & Stocker-Buschina, 1995).

Dem gegenüber stehen die Beobachtungen, dass eine Behandlung juveniler Zebrafinkenmännchen mit Fadrozol die Expression „*Brain derived neurotrophic factor*“ (BDNF) im HVC hemmt (Dittrich et al., 1999), einem Neurotrophin, dass einen wichtigen Einfluss auf das Gesangslernen hat (Dittrich et al., 2013). Auch haben elektrophysiologische Studien am juvenilen IMAN männlicher Zebrafinken gezeigt, dass Dihydrotestosteron die Reifung des neuronalen Aktivitätsmusters in diesem Gesangkern beschleunigt (Livingston & Mooney, 2001).

Zur Detektion von östradiolabhängigen Veränderungen der Genexpression im HVC, und den damit verbundenen neuronalen Prozessen, habe ich Zebrafinken zu drei Altersstadien für zwei unterschiedlich lange Zeiträume mit 17 β -Östradiol behandelt. Während im ersten Versuchsansatz (Kapitel 4.2.1) mittelfristige Effekte durch eine Eintagesbehandlung untersucht werden sollten, zielte der zweite Versuchsansatz (Kapitel 4.2.2) auf die Analyse längerfristiger Effekte nach einer Siebentagebehandlung ab. Im Gegensatz zur Entwicklungsstudie, bei der adulte Zebrafinken als Kontrolltiere dienten, wurde die Genexpression nach einer Östradiolbehandlung meist relativ zu gleichaltrigen, mit Placebopellets behandelten Zebrafinken ermittelt. Eine Ausnahme stellt die Auswertung der Ergebnisse in Kapitel 4.2.5 und 4.2.6 dar, für die hormonell bedingte Veränderungen der Genexpression im HVC zwischen den Altersstadien verglichen wurden. Hier dienten adulte Tiere als Referenzgruppe.

4.2.1. Eintagesbehandlung

Je sechs männliche Zebrafinken wurden zu drei Zeitpunkten während der Gesangslernphase für die Dauer von einem Tag mit Östradiol- („1Tag-Ö₂-“) oder Placeboimplantaten („Kontrollen“) behandelt. Gruppe eins, bestand aus 19 Tage alten Tieren und repräsentiert Zebrafinken, welche die sensorische Phase noch nicht erreicht haben („1Tag-Ö₂-19“). Gruppe zwei wird von 50 Tage alten Tieren gebildet („1Tag-Ö₂-50“). Sie befinden sich in der sensomotorischen Phase, während der Zebrafinkenmännchen ihren Gesang an das Tutormodell anpassen. Gruppe drei setzte sich aus 100 Tage alten Tieren zusammen („1Tag-Ö₂-

100“). Diese Tiere sind bezüglich ihres Gesangs als adult anzusehen, da Vögel in diesem Alter einen kristallisierten Gesang aufweisen (Immelmann, 1969; Zann, 1996).

4.2.1.1. Anzahl regulierter Gene

In allen drei Gruppen zusammengekommen induzierte die eintägige Östradiolbehandlung bei 5154 Genen eine signifikante Veränderung in der Expression (Expressionsstärke $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0). Nach Gruppen aufgeschlüsselt wurden bei 1Tag-Ö₂-19 2379, bei 1Tag-Ö₂-50 2779 und bei 1Tag-Ö₂-100 3196 Gene signifikant reguliert (Abb. 4.4).

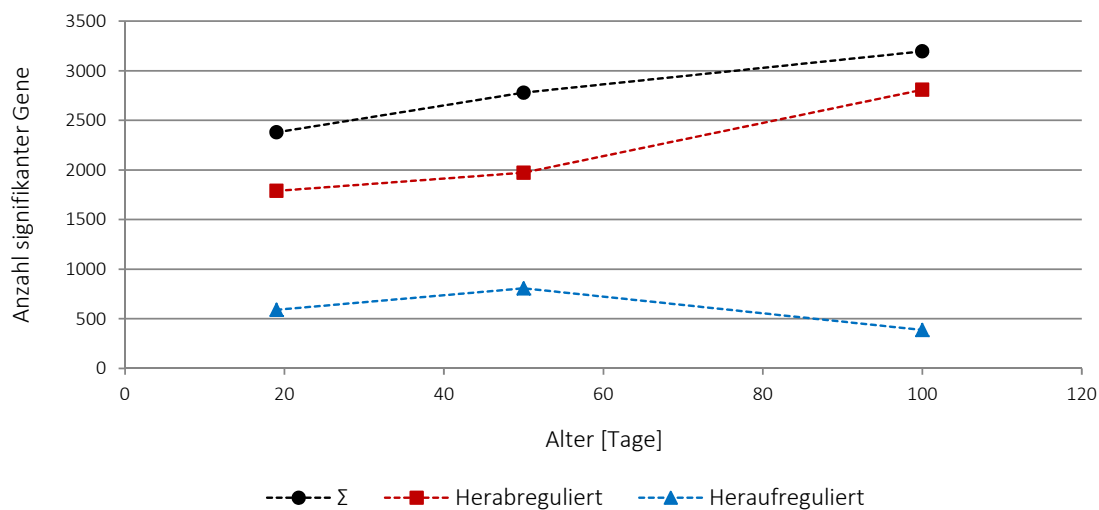


Abb. 4.4. Anzahl der relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich regulierten Gene im HVC nach eintägiger Behandlung mit Östradiol (Expressionsstärke $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der absoluten Anzahl (schwarz) und nach Unterteilung in herab- (rot) und heraufregulierte (blau) Gene.

Eine nach Expressionsrichtung differenzierte Betrachtung ergab, dass die Eintagesbehandlung über alle Gruppen hinweg mehrheitlich zu einer signifikanten Herabregulation, also einer Inhibition der Genexpression gegenüber den gleichaltrigen Kontrollgruppen führte (Abb. 4.4). Während die Expressionsveränderung für beide Richtungen in den ersten beiden untersuchten Stadien beinahe parallel verlief, war ihre weitere Veränderung gegenläufig. So nahm die Anzahl der negativ regulierten Gene deutlich stärker zu, während die der positiv regulierten deutlicher abfiel. Dieses Profil spiegelte sich im Verhältnis der herauf- zu

den herabregulierten Gene wieder (Tab. 4.13) und deutete auf eine altersabhängige Zunahme der Östradiolsensitivität der Genexpression des HVC hin.

Tab. 4.13. Angabe der Expressionsmaxima und –minima, sowie der Quotienten der Anzahl herauf- zu herabregulierter Gene im HVC männlicher Zebrafinken nach eintägiger Östradiolbehandlung.

	1Tag-Ö ₂ -19	1Tag-Ö ₂ -50	1Tag-Ö ₂ -100
heraufreguliert	5,82	3,43	2,82
herabreguliert	0,38	0,22	0,28
Verhältnis	1:3	1:2,4	1:7,3

4.2.1.2. Schnittmengen der Gene nach Eintagesbehandlung mit Östradiol

Grundsätzlich war die Anzahl der herabregulierten Gene, die die Schnittmenge zweier oder aller drei Altersstadien bildeten höher, als die der heraufregulierten (Abb. 4.5). Am stärksten verdeutlichte dies der Vergleich aller drei Gruppen. Während 512 Gene (=12,0%) in allen Stadien herabreguliert waren, betrug die Anzahl der heraufregulierten 16 Gene (=1,0%). Auffallend war zudem eine in etwa gleich bleibende Anzahl an positiv wie auch negativ regulierten Genen bei 1Tag-Ö₂-19 und 1Tag-Ö₂-50. Bei 1Tag-Ö₂-100 hingegen lag die Anzahl der negativ regulierten deutlich höher als die der positiv regulierten (Abb. 4.5).

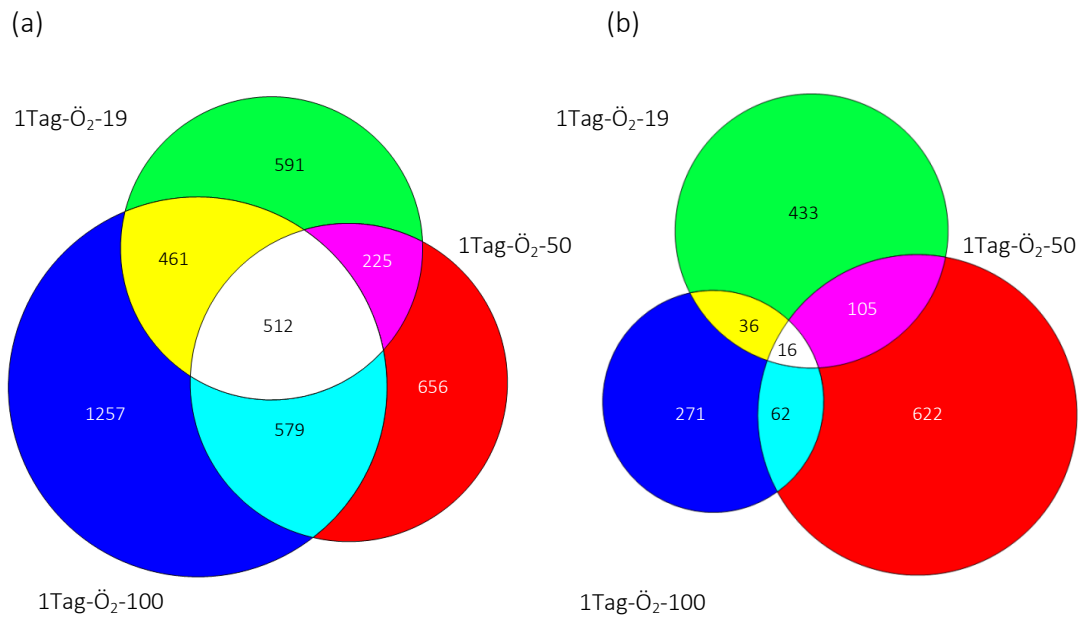


Abb. 4.5. Anzahl der im HVC in allen drei Altersstadien nach eintägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe regulierten Gene (Expressionswert $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0), aufgeschlüsselt nach Expressionsrichtung (links: herabregulierte, rechts: heraufregulierte Gene). Die Größe der Kreise innerhalb eines Diagramms korreliert mit der Anzahl der jeweiligen Gene. Die Überlappungen der Kreise repräsentieren die Anzahl der Gene, die in den jeweiligen Altersstadien in gleicher Weise reguliert sind.

Aus der Analyse der Schnittmengen ging ferner hervor, dass mehr heraufregulierte als herabregulierte Gene Stadienspezifität aufweisen. Dies trat besonders in der Gruppe 1Tag-Ö₂-19 zu Tage, wo eine stadienspezifische Regulation 33,2% der herabregulierten, aber 77,4% der heraufregulierten Gene betraf (Abb. 4.5). Stark altersabhängig verlief das Verhältnis der altersspezifisch regulierten Gene. Während bei 1Tag-Ö₂-19 und 1Tag-Ö₂-50 eine etwa vergleichbare Anzahl an Genen reguliert war, induzierte Östradiol bei 1Tag-Ö₂-100 ca. sechsmal mehr herab- als heraufregulierte Gene.

Inwieweit sich die östradiolinduzierten Effekte auf die Genexpression im HVC auch in funktionellen Einheiten zusammenfassen ließen, wurde im Folgenden untersucht.

4.2.1.3. Kanonische Signalwege

In allen drei Altersgruppen führte die eintägige Östradiolbehandlung zur signifikanten Überrepräsentation von kanonischen Signalwegen, wobei die Anzahl der altersspezifischen Signalwege mit zunehmendem Alter anstieg. Im Folgenden werde ich auf die am stärksten überrepräsentierten Cluster ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$) näher eingehen (Tab. 4.14).

Tab. 4.14. Kanonische Signalwege, die im Rahmen einer „Canonical pathway analysis“ (Genomatix) der unterschiedlich exprimierten Gene im HVC nach eintägiger Östradiolgabe gegenüber den gleichaltrigen Kontrolltieren als signifikant überrepräsentiert detektiert wurden ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalweges angegeben.

1Tag-Ö ₂ -19	1Tag-Ö ₂ -50	1Tag-Ö ₂ -100		
1:11,5	1:7,7	1:6,8	BETA1 INTEGRIN CELL SURFACE INTERACTIONS	-7
1:8,0	1:7,0	1:7,0	PLATELET AMYLOID PRECURSOR PROTEIN PATHWAY	-6
1:10,0	1:7,4	1:7,7	FILOPODIUM FORMATION (INTEGRIN SIGNALING PATHWAY)	-5
	1:3,0		SIGNALING EVENTS MEDIATED BY TCPTP	-4
	1:4,7		REGULATION OF RAC1 ACTIVITY	-3
				-2

Die tabellarisch dargestellten kanonischen Signalwege waren in den beiden jüngeren Altersstadien durch deutlich mehr herabregulierte Gene vertreten, als die Verhältnisses aller regulierten Gene zu erwarten ließen (vergl. Tab. 4.13). Zudem ist anzumerken, dass sich kein einziger Signalweg durch mehr herauf- als herabregulierte Gene zusammensetzte. Somit führte die Eintagesbehandlung mit Östradiol in allen Altersgruppen mehrheitlich zu einer Herabregulation auch jener Gene, die hoch signifikant veränderte kanonische Signalwege repräsentierten.

In allen drei Behandlungsstadien wurde eine deutliche Überrepräsentation des Signalwegs „Beta integrin surface pathway“ detektiert, hauptsächlich vertreten durch Kollagene und Integrine. Die Funktion dieses Clusters besteht in der Weiterleitung von Signalen aus der Extrazellulären Matrix in die Zelle und spielt somit bei der Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle (van der Flier & Sonnenberg, 2001). Wichtige Funktionen übernehmen Integrine zudem bei der Vaskularisierung (Malinin et al., 2012) und bei der Remodellierung dendritischer

Dornfortsätze (Bourgin et al., 2007). Fibronectin (FN) bildete in allen drei Stadien das zentrale Gen dieses Clusters und war signifikant herabreguliert.

Des Weiteren war der Signalweg „*Platelet amyloid precursor protein pathway*“ in allen drei Versuchsgruppen signifikant überrepräsentiert. Er wurde bereits in der Entwicklungsstudie detektiert und ist dort beschrieben (siehe Kapitel 4.1.4.3). Das zentrale Gen im hier detektierten Netzwerk bildete das Enzym „*Plasminogen activator, urokinase*“ (PLAU), eine Protease, die in den Degradationsprozess der Extrazellulären Matrix involviert ist.

Die dritte derart signifikant überrepräsentierte Signaltransduktionskette ist maßgeblich an der Ausbildung von Filopodien beteiligt, zusammengefasst unter dem Terminus „*Filopodium formation*“. Sie war bei 1Tag-Ö₂-50 und 1Tag-Ö₂-100 signifikant überrepräsentiert. Bei Filopodien handelt es sich um hochdynamische, zytoplasmatische Projektionen, bestehend aus Aktin-Bündeln, die der Zellmigration und der Ausprägung von Zell-Zell Interaktionen dienen (Mattila & Lappalainen, 2008). Filopodien sind unter anderem auch essentiell für die Ausbildung von Wachstumskegeln bei neuronalen Projektionen und Synapsen (Kruger et al., 2005; Neufeld et al., 2002). In diesem Cluster nahm das herabregulierte Onko-Gen „*vsrc-Sarcoma*“ (SRC) die zentrale Position ein. Es reguliert maßgeblich Zellwachstum und Zelldifferenzierung und ist daher im Fokus der Krebsforschung (Weiss & Vogt, 2011).

Ausschließlich bei 1Tag-Ö₂-50 waren die Signaltransduktionsketten „*Regulation of RAC1 activity*“ und „*Signaling events mediated by TCPTP*“ signifikant reguliert. Das pleiotropisch aktive Gen „*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*“ (RAC1) wird zu den GTPasen gezählt und steuert diverse zelluläre Funktionen, wie den Umbau des Zytoskeletts, die Genexpression und die Produktion von Superoxiden (für Übersichtsartikel: Heasman & Ridley, 2008). Im Zentrum des Clusters stand das herabregulierte Protoonko-Gen „*MCF.2 cell line derived transforming sequence*“ (MCF2), eine GTPase, die unter anderem das Neuritenwachstum reguliert. TCPTP (PTPN2), das zentrale Gen des zweiten Signalwegs, codiert das Protein „*Tyrosin phosphatase*“ und vermittelt Wachstumsfaktor-induzierte Signaltransduktion (Mattila et al., 2008).

Somit veränderte die eintägige Östradiolbehandlung während der Phase des Gesangslernens kanonische Signalwege, die an der Zell-Matrix-Interaktion und der Bildung von Zellfortsätzen beteiligt sind, wobei sie die Expression des Großteils der betroffenen Gene hemmte. Bei den detektierten Prozessen handelt es sich um allgemein bekannte östradiolinduzierte Wirkmechanismen in neuronalem Gewebe (Wright et al., 2010; für Übersichtsartikel: McCarthy, 2008).

4.2.1.4. Biologische Prozesse

Analog zur Entwicklungsstudie wurden auch die im HVC nach eintägiger Östradiolbehandlung regulierten Gene hinsichtlich der überrepräsentierten biologischen Prozesse analysiert. In Summe konnten in den drei Altersgruppen 683 Prozesse detektiert werden ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$), wobei deren Anzahl positiv mit dem Alter korrelierte (Tab. 4.15). Gemessen an den Stärken der detektierten Signifikanzniveaus war die Genexpression der Gruppe 1Tag-Ö₂-50 am deutlichsten verändert, am schwächsten die der Gruppe 1Tag-Ö₂-19. Für alle Prozesse galt, dass die Mehrzahl der sie repräsentierenden Gene herabreguliert war, wobei das Mengenverhältnis zwischen herab- und heraufregulierten Genen abhängig vom biologischen Prozess stark variierte. Während dieses Verhältnis für den „*Protein metabolic process*“ infolge der eintägigen Behandlung mit Östradiol in allen drei Gruppen recht konstant bei ca. 1:3 lag, war für andere Prozesse, wie „*Cell projection organization*“ eine stark altersabhängige Zunahme des Anteils an herabregulierten Genen festzustellen (Tab. 4.15).

Ebenso wie die Analyse kanonischer Signalwege, so offenbarte die Auswertung hinsichtlich der biologischen Prozesse bei allen Altersgruppen einen Einfluss der eintägigen Östradiolbehandlung auf die Entwicklung von Zellfortsätzen. Darüber hinaus schien Östradiol Modifikationen bei Proteinen und Chromatin zu verursachen und den Proteinstoffwechsel, den Zellzyklus und den Transport über die Zellmembran hinweg zu regulieren.

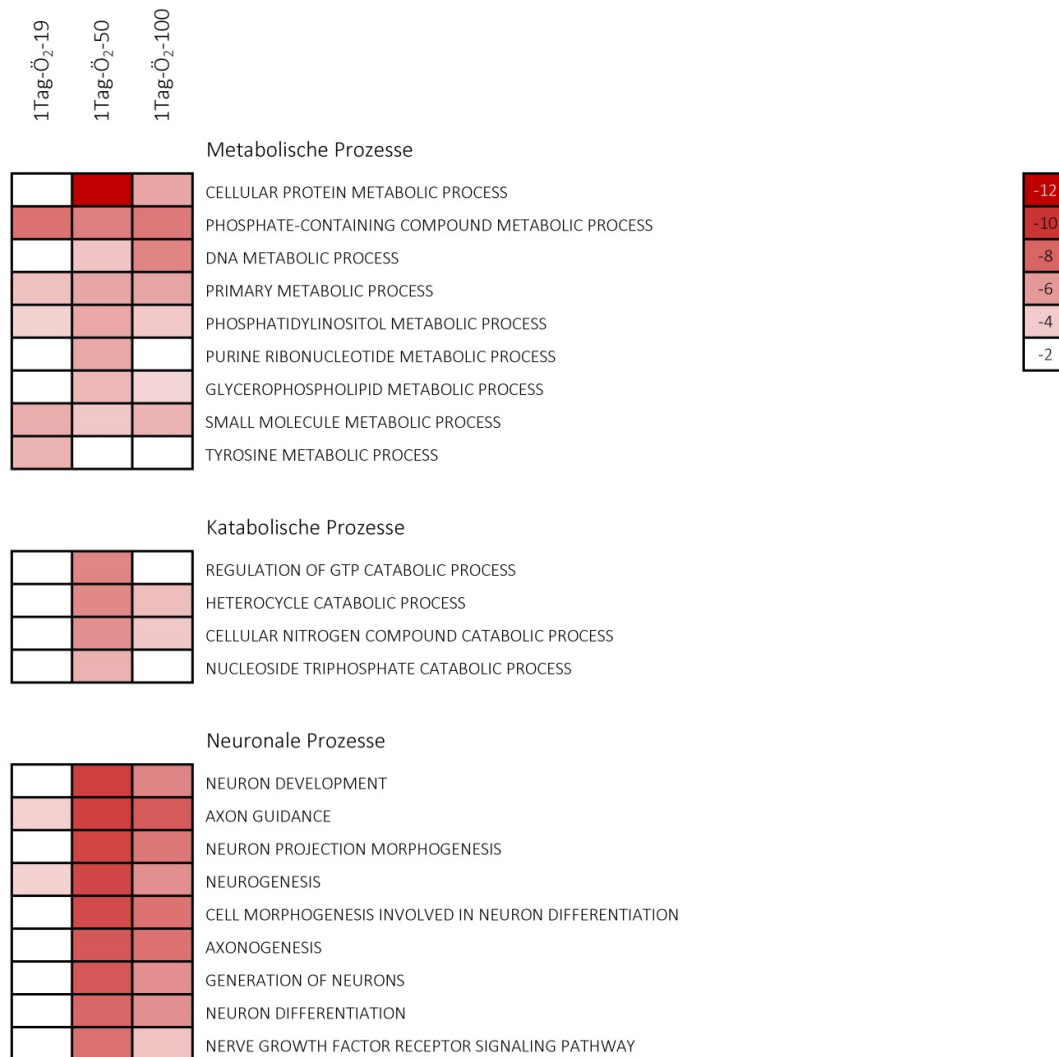
Tab. 4.15. Biologische Prozesse, die im HVC nach eintägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert waren. Angegeben ist deren Anzahl ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) und für hoch signifikant veränderte Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-10}$) eine Spezifizierung, wobei redundante Nennungen aus der mittels GePS (Genomatrix) ermittelten Liste entfernt wurden. Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

1Tag-Ö ₂ -19	1Tag-Ö ₂ -50	1Tag-Ö ₂ -100		
1:3,3	1:2,6	1:2,6	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-25
1:6,8	1:5,7	1:5,9	CELLULAR PROCESS	-21
1:3,0	1:2,8	1:5,3	ORGANELLE ORGANIZATION	-17
1:3,3	1:2,9	1:2,6	ESTABLISHMENT OF LOCALIZATION	-13
1:2,7	1:2,6	1:4,9	PROTEIN MODIFICATION PROCESS	-9
	1:2,4	1:3,9	CELLULAR PROTEIN METABOLIC PROCESS	-5
1:3,7	1:5,0	1:7,9	CELL PROJECTION ORGANIZATION	
	1:3,1	1:9,0	REGULATION OF SMALL GTPASE MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION	
1:2,9	1:2,5	1:3,0	PROTEIN METABOLIC PROCESS	
	1:5,1	1:8,2	CELL PROJECTION MORPHOGENESIS	
	1:5,0	1:5,8	CHROMATIN MODIFICATION	
1:4,2	1:3,8	1:2,5	DEVELOPMENTAL PROCESS	
1:2,2	1:2,0	1:4,8	CELL CYCLE PROCESS	
1:4,0	1:4,8	1:7,5	CELL MORPHOGENESIS	
1:4,6	1:4,1	1:4,8	CELLULAR DEVELOPMENTAL PROCESS	
1:4,2	1:4,4	1:6,5	ANATOMICAL STRUCTURE MORPHOGENESIS	
1:3,8	1:4,5	1:7,2	CELLULAR COMPONENT MORPHOGENESIS	
	1:4,3	1:6,2	NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	
1:5,0	1:4,5	1:12,4	TRANSMEMBRANE TRANSPORT	
1:3,2	1:4,8	1:7,5	AXON GUIDANCE	
256	375	441	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-2}$)	

Betrachtet man die Wirkung der eintägigen Östradiolbehandlung auf die biologischen Prozesse unter einem Blickwinkel, der einem Einsicht auf jene biologischen Prozesse gewährt, die von den meisten in ihrer Expression veränderten Gene betroffen waren, so zeigten sich drei davon als stark überrepräsentiert: Metabolismus, Katabolismus und Neuronale Prozesse (Tab. 4.16). Wie bereits gezeigt wurde (Tab. 4.15), galt auch für diese Signalwege, dass die Mehrzahl der Gene, aus welchen sie sich zusammensetzen, signifikant herabreguliert war. Bemerkenswert verlief eine altersabhängige Veränderung der Genexpression. Katabolische und nahezu alle neuronalen Prozesse waren ausschließlich bei den beiden ältesten Gruppen signifikant überrepräsentiert. Bei den metabolischen Prozessen waren bei allen drei Altersgruppen Proteine

betroffen, während der Nukleinsäuremetabolismus nur bei den beiden älteren Gruppen verändert erschien.

Tab. 4.16. Infolge eintägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant überrepräsentierte metabolische, katabolische und neuronale Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$). Die Auswahl dieser drei Gruppen basierte auf der hohen Anzahl der durch sie repräsentierte Gene. Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Auf die Nennung der Verhältniszahlen wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Sie entsprachen weitestgehend jenen Werten, die bereits zuvor (Tab. 4.15) ermittelt werden konnten.



Fokussiert man diese Analyse der Östradiolwirkung nach eintägiger Behandlung auf zuvor noch nicht detektierte neuronale Prozesse, zeigte sich ein hormoneller Einfluss auf die Neurogenese und eine Wirkung auf den "*Nerve growth factor receptor signaling pathway*".

Zusammenfassend führte die eintägige Östradiolbehandlung zur Überrepräsentation von 683 funktionell teils überlappenden biologischen Prozessen, welche sich aus überwiegend herabregulierten Genen rekrutierten. Das Verhältnis der herauf- zu herabregulierten Gene sank mit steigendem Alter. Durch eine vergleichsweise hohe Anzahl an Genen waren die Gruppen Katabolismus, Metabolismus und neuronale Prozesse vertreten, welche stadienspezifisch unterschiedlich auf die Hormongabe reagierten. Die Stadien 1Tag-Ö₂-50 und 1Tag-Ö₂-100 zeichneten sich dabei durch eine verstärkte Östradiolsensitivität aus, was sich vor allem in den detektierten katabolischen, metabolischen und neuronalen Prozessen niederschlug (Tab. 4.16).

4.2.2. Siebentagesbehandlung

Zur Untersuchung östradiolinduzierter Langzeiteffekte auf die Genexpression im HVC männlicher juveniler Zebrafinken wurden analog zum Kurzzeitversuch je sechs männliche Zebrafinken zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten des Gesanglernens für die Dauer von sieben Tagen mit Östradiol („7Tage-Ö₂-“) und Placeboimplantaten behandelt. Gruppe eins, bestehend aus 25 Tage alten Vögeln, die am 18-ten Tag implantiert und am 25-ten Tag getötet wurden („7Tage-Ö₂-25“), repräsentierte den Zeitraum des Übergangs in die sensorische Phase, in der die Tiere den Gesang eines oder mehrerer Tutoren memorieren. Die Vögel der zweiten Gruppe wurde nach siebentägiger Östradiolbehandlung im Alter von 50 Tage getötet („7Tage-Ö₂-50“). Sie befanden sich in der sensomotorischen Phase, in der Zebrafinken ihren Gesang an das zuvor erlernte Tutormodell anpassen. Gruppe drei setzte sich aus entsprechend lange behandelten 100 Tage alten Vögeln („7Tage-Ö₂-100“) zusammen. In diesem Alter sind Zebrafinken bezüglich des Gesanglernens adult, ihr Gesang somit kristallisiert und stereotyp.

4.2.2.1. Anzahl regulierter Gene

Infolge der siebentägigen Behandlung mit Östradiol wurden in allen drei Altersgruppen zusammengenommen 7842 Gene signifikant in ihrer Expression verändert (Expressionsstärke $\geq \log_2 0,5$; FDR = 0,0). Nach Gruppen aufgegliedert entsprach dies 4115 Genen bei 7Tage-Ö₂-25, 4909 bei 7Tage-Ö₂-50 und 6054 bei 7Tage-Ö₂-100. Damit kam es im Vergleich zur eintägigen Behandlung in allen Altersgruppen beinahe zu einer Verdopplung der Anzahl in ihrer Expression veränderter Gene (Abb. 4.6).

Bei allen drei Altersgruppen war die Mehrzahl der Gene heraufreguliert (Abb. 4.6). Darin unterschied sich die siebentägige Behandlung grundlegend von der Eintagesbehandlung mit Östradiol. Wie auch nach eintägiger Östradiolgabe ging die siebentägige Hormongabe mit einer mit dem Alter ansteigenden Sensitivität der Genexpression im HVC gegenüber Östradiol einher. Dieser Vorgang basierte größtenteils auf einer Zunahme der Anzahl herabregulierter Gene, während die der heraufregulierten Gene konstant blieb, womit die zunehmende Östradiolsensitivität älterer Vögel wie bei der Eintagesbehandlung zur vermehrten Herabregulation von Genen führte. Die Verkleinerung des Verhältnisses der herauf- zu den herabregulierten Genen spiegelte diese positive Korrelation der Anzahl herabregulierter Gene mit dem Alter bei gleichzeitiger Konstanz der Anzahl heraufregulierter Gene während der Gesangsentwicklung wieder (Tab. 4.17).

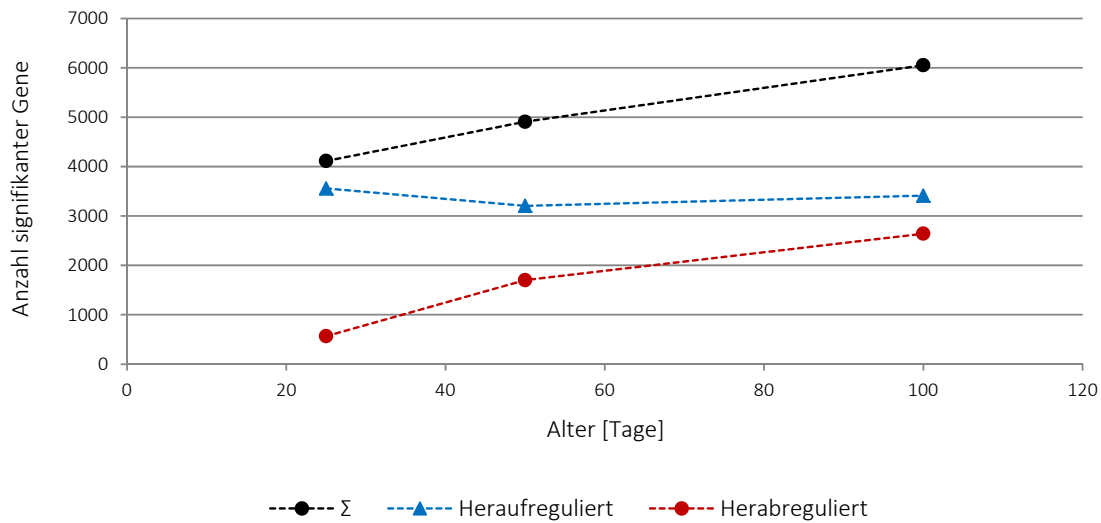


Abb. 4.6. Anzahl der relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich regulierten Gene im HVC nach siebentägiger Östradiolbehandlung. Der parallele Entwicklungsverlauf der Gesamtanzahl regulierter Gene (schwarze Kurve) und der Anzahl herabregulierter Gene (rote Kurve) verdeutlicht, dass eine zunehmende Hemmung der Genexpression im HVC für die stärkere Veränderung der Genexpression in älteren Vögeln verantwortlich war.

Tab. 4.17. Expressionsmaxima und-minima nach siebentägiger Östradiol-Gabe (faktoriell), sowie das Verhältnis der Anzahl der herauf- zu herabregulierten Gene

	7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100
heraufreguliert	4,20	4,00	4,99
herabreguliert	0,28	0,21	0,23
Verhältnis	6,3:1	1,9:1	1,3:1

4.2.2.2. Schnittmengen

Die Analyse der Schnittmengen der im HVC nach siebentägiger Östradiolbehandlung herab- und heraufregulierten Gene zeigte, dass die beiden ältesten Gruppen sich deutlich von der jüngsten Versuchsgruppe unterschieden. Während die Schnittmenge der herabregulierten Gene der beiden ältesten Versuchsgruppen 41,1% aller negativ regulierten Gene umfasste (Abb. 4.7), fielen die Schnittmengen der beiden älteren Gruppen mit 7Tage-Ö₂-25 deutlich geringer aus. Sie betrugen lediglich 1,6% (zu 7Tage-Ö₂-50) bzw. 2,7% (zu 7Tage-Ö₂-100) (Abb. 4.7). Folglich unterschieden sich die jüngeren Tiere in ihrer östradiolinduzierten Genexpression

deutlich von den älteren, was sich schließlich auch in der Schnittmenge der drei Gruppen ausdrückte, welche lediglich 1,1% aller regulierten Gene umfasste.

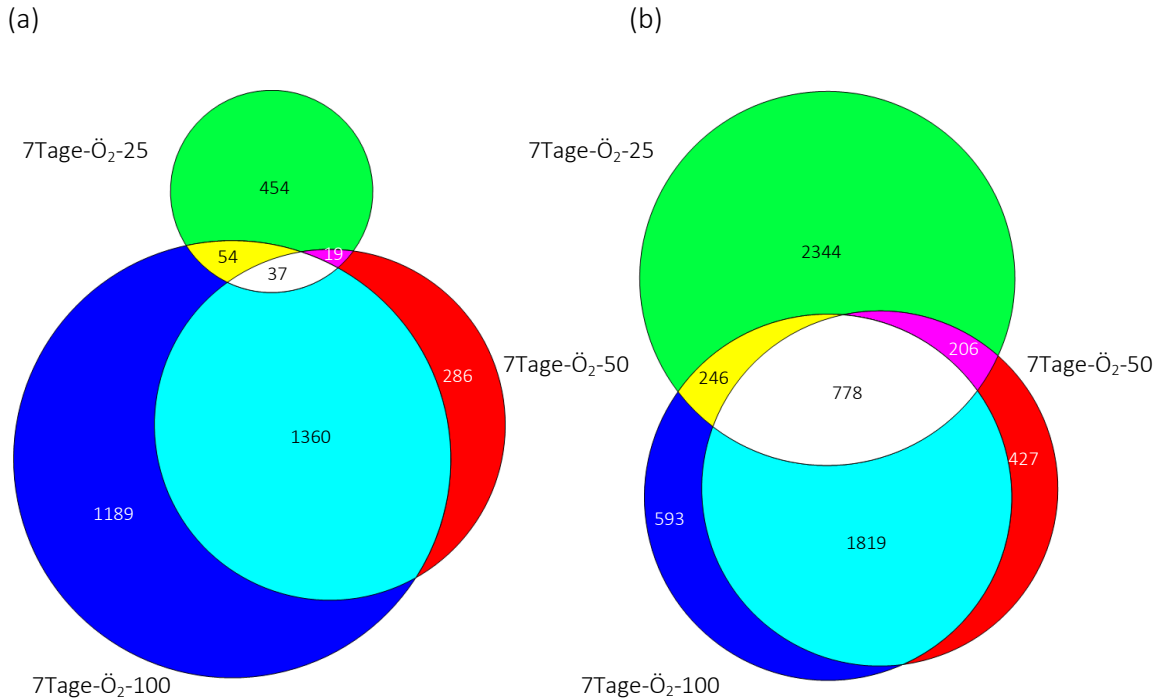


Abb. 4.7. Anzahl der relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe regulierten Gene zu allen drei Altersstadien nach siebentägiger Östradiolbehandlung, aufgeschlüsselt nach Expressionsrichtung (a) herabregulierte, (b) heraufregulierte Gene, dargestellt durch Venn-Diagramme. Die Größe der Kreise innerhalb eines Diagramms korreliert mit der Anzahl der jeweiligen Gene. Die Überlappungen der Kreise repräsentieren die Anzahl der Gene, die in den jeweiligen Altersstadien in gleicher Weise reguliert sind.

Die Anzahl der heraufregulierten Gene war über alle Altersstadien hinweg relativ konstant (Abb. 4.6). Auch bezüglich der heraufregulierten Gene zeigte sich ein deutlicher Alterseffekt, wenngleich weniger stark ausgeprägt. So betrug die Schnittmenge der beiden älteren Gruppen 41,4% und lag damit erneut deutlich über denen der beiden älteren Gruppen mit der Gruppe 7Tage-Ö₂-25 (14,9% für 7Tage-Ö₂-25 vs. 7Tage-Ö₂-50; 15,5% für 7Tage-Ö₂-25 vs. 7Tage-Ö₂-100).

Aus dem Vergleich der Wirkung der östradiolen Behandlungsdauer auf die Schnittmengen ging hervor, dass die Stadienspezifität nach Eintagesbehandlung in erster Linie die heraufregulierten Gene betraf (Abb. 4.5), während sie nach siebentägiger Behandlung stärker bei den herabregulierten Genen zu Tage trat (Abb. 4.7). Somit war nach beiden

Behandlungszeiten jene Gengruppe eher stadienspezifisch exprimiert, die weniger Gene umfasste. Mit anderen Worten, die meisten Gene reagierten mit einer Expressionsänderung, die von der Behandlungsdauer und dem Alter der Vögel unabhängig war. Die Rolle der Behandlungsdauer für die Wirkung von Östradiol auf die Genexpression im HVC wurde im Kapitel 4.2.3 untersucht. Altersspezifische Einflüsse sind den folgenden zwei Kapiteln zu entnehmen.

4.2.2.3. Kanonische Signalwege

Die drei Altersstadien unterschieden sich hinsichtlich der überrepräsentierten Signaltransduktionsketten voneinander, weswegen die Wirkung der siebentägigen Östradiolbehandlung auf die Genexpression im HVC für jedes Altersstadium getrennt beschrieben wird. Dabei lag der Anteil hochregulierter Gene an den hoch signifikant veränderten kanonischen Signalwegen bei der jüngsten Altersgruppe am höchsten (Tab. 4.18). Dabei war der Anteil hochregulierter Gene an den hoch signifikant veränderten kanonischen Signalwegen bei der jüngsten Altersgruppe am größten (Tab. 4.18). Im Folgenden wird nur auf jene überrepräsentierten Signalwege eingegangen, die einen Signifikanzwert von unter $1 \cdot 10^{-4}$ aufwiesen. Eine vollständige Auflistung ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$) ist dem Anhang zu entnehmen.

7Tage-Ö₂-25

Bei der Gruppe 7Tage-Ö₂-25 erfüllten drei Signaltransduktionsketten das oben erwähnte Kriterium. Dazu zählten die beiden Signalwege „*AKT/PKB- signaling pathway*“ und „*VEGF signaling pathway*“. Für eben diese Signalwege hatte die Entwicklungsstudie ergeben, dass beim Übergang von der Altersgruppe ENTW-19 zu älteren Vögeln der Anteil herabregulierter Gene zunahm. Dies bedeutet, dass die Vögel des jüngsten Altersstadiums sich durch eine relativ große Zahl von Genen dieser Signalwege auszeichneten, die heraufreguliert waren. Eine siebentägige Östradiolbehandlung verstärkte diesen Expressionstrend.

Ein weiterer überrepräsentierter Signalweg wird als „*Cytokine receptor degradation pathway*“ beschrieben, in dessen Zentrum sich „*Signal transducer and activator of transcription 3*“ (*STAT3*) stand. Bei *STAT3* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor dessen Produkt, in Prozessen der Zell-Zellkommunikation, des Zellwachstum und -differenzierung involviert ist (für Übersichtsartikel siehe: Pan et al., 2011).

Tab. 4.18. Kanonische Signalwege, die im Rahmen einer „Canonical pathway analysis“ (Genomatrix) der unterschiedlich exprimierten Gene im HVC nach siebentägiger Östradiolgabe relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe als signifikant überrepräsentiert detektiert wurden ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}), mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100		
9,6:1		1,4:1	AKT(PKB)-BAD SIGNALING (IL-7 SIGNALING(JAK1 JAK3 STATS))	-7
8,4:1		1,3:1	AKT(PKB)-BAD SIGNALING (EPO SIGNALING PATHWAY(JAK2 STAT1 STAT3 STATS))	-6
10,7:1		1,4:1	GENE EXPRESSION (VEGF SIGNALING PATHWAY)	-5
11,5:1			CYTOKINE RECEPTOR DEGRADATION SIGNALING	-4
	4,8:1	2,9:1	REGULATION OF RAC1 ACTIVITY	-3
	6,4:1	3,0:1	BETA1 INTEGRIN CELL SURFACE INTERACTIONS	-2
		1,0:1	PDGF SIGNALING PATHWAY	

7Tage-Ö₂-50

Bei 7Tage-Ö₂-50 ergab die Analyse die Überrepräsentation zweier Signaltransduktionsketten. Zum einen konnte der Signalweg „*Agrin in postsynaptic differentiation*“ nachgewiesen werden. Das namensgebende Genprodukt „*Agrin*“ (*AGRN*), ein Proteoglykan, reguliert die Aggregation von Acetylcholinrezeptoren und ist an der Differenzierung von Synapsen in Motoneuronen beteiligt (Rupp et al., 1991; Kröger & Schröder, 2002). Zudem ist *AGRN* verstärkt in interneuronalen Synapsen nachgewiesen worden (Kröger & Mann, 1996; Kröger & Schröder, 2002).

Die zweite Gruppe ist Teil des Signalwegs „*Beta1 integrin cell surface interactions*“. Gene dieses Signalwegs dienen der Signaltransduktion aus der Extrazellulären Matrix in die Zelle. Im Nervensystem sind Integrine maßgeblich an den Prozessen Axon- und Dendritenwachstum, Synapsenbildung, Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt (Clegg, 2000; Milner & Campbell, 2002; Bernard-Trifilo et al., 2005). Dieser Signalweg war ebenfalls nach der Eintagesbehandlung mit Östradiol im HVC aller Altersgruppen signifikant reguliert, nur waren dann stets mehr Gene herab- als heraufreguliert. Dies bedeutet, dass im HVC juveniler Zebrafinkenmännchen im Alter von 50 Tagen die Regulationsrichtung der Expression einer Mehrheit der Gene ein und desselben kanonischen Signalweges von der Behandlungsdauer abhängig war.

7Tage-Ö₂-100

Bei 7Tage-Ö₂-100 erreichten zwei Signalwege das Signifikanzniveau von $1 \cdot 10^{-4}$. Vier weitere, die bereits in den übrigen Stadien detektiert worden waren, lagen knapp über der *a priori* festgelegten Schranke und wurden daher ergänzt. Erneut war das Gencluster „*VEGF*

signaling pathway“ signifikant überrepräsentiert. Der zweite Signalweg, „*Platelet derived growth factor signaling pathway*“, reguliert ebenso wie der erste unter anderem Prozesse der Vaskulo- und Angiogenese im Zentralen Nervensystem (Pringle et al., 1992; Battegay et al., 1994; Lange et al., 2009).

Auf der Ebene der durch Östradiolgabe veränderter Signalwege kam es nach eintägiger Behandlung primär zur Hemmung der Zell-Matrix-Interaktion (siehe Kapitel 4.2.1.3), während die nach siebentägiger Hormongabe detektierten Expressionsunterschiede zumindest bei den 25 und 100 Tage alten Zebrafinkenmännchen besonders stark auf der Heraufregulation von Signalkaskaden beruhten, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden.

4.2.2.4. Biologische Prozesse

Alle nach einer siebentägigen Östradiolbehandlung signifikant regulierten Gene wurden hinsichtlich der überrepräsentierten biologischen Prozesse analysiert, wovon in allen drei Altersgruppen zusammengekommen 833 detektiert werden konnten ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Tabellarisch dargestellt ist ein Auszug der am stärksten überrepräsentierten Prozesse (Tab. 4.19).

Wie nach der eintägigen Östradiolbehandlung korrelierte die Anzahl der signifikant überrepräsentierten Prozesse, sowie das Level der detektierten Signifikanzwerte auch hier positiv mit dem Alter (Tab. 4.19), was eine stärkere Östradiolsensitivität der älteren Gruppen bestätigte. Insgesamt konnten bei einem Signifikanzwert von $1 \cdot 10^{-5}$ eine hohe Ähnlichkeit der betroffenen Prozesse sowohl nach ein-, wie auch nach siebentägiger Behandlung detektiert werden. Wieder waren im Speziellen der Proteinmetabolismus und das Wachstum von Zellfortsätzen betroffen. Ein grundsätzlicher Unterschied bestand jedoch darin, dass die siebentägige Östradiolgabe zu einer verstärkten Aktivierung der Transkription assoziierter Gene führte, was vor allem bei der Gruppe 7Tage-Ö₂₅ deutlich ausgeprägt war. Hier betrug das Verhältnis der herauf- zu herabregulierten Gene für die dargestellten Prozesse 6,6:1 (vergl. dagegen 1,4:1 bei 7Tage-Ö₂₁₀₀). Somit waren nach ein- und siebentägiger Östradiolbehandlung ähnliche biologische Prozesse durch eine signifikante Veränderung der Genexpression charakterisiert, jedoch war die Expressionsrichtung der meisten assoziierten Gene gegenläufig. Diese Beobachtung stimmte mit der Altersabhängigkeit der nach siebentägiger Östradiolbehandlung veränderten Anzahl herab- und heraufregulierter Gene überein (Abb. 4.6). Ausnahmen von diesem Trend stellten die beiden biologischen Prozesse „*Cellular/macromolecular localization*“ und „*Intracellular transport*“ bei der Gruppe 7Tage-Ö₂₁₀₀ dar, bei denen mehr herab als heraufregulierte Gene vertreten waren.

Tab. 4.19. Analyse der im HVC nach siebentägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe am stärksten signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse. Dargestellt sind signifikante Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-10}$) und die Gesamtanzahl ($p < 1 \cdot 10^{-2}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100		
6,0:1	1,7:1	1,3:1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-35
5,7:1	1,6:1	1,1:1	ORGANELLE ORGANIZATION	-29
7,0:1	1,6:1	1,2:1	ESTABLISHMENT OF LOCALIZATION	-23
7,3:1	1,4:1	0,9:1	CELLULAR PROTEIN METABOLIC PROCESS	-17
7,0:1	1,6:1	1,2:1	TRANSPORT	-11
7,0:1	1,8:1	1,1:1	MACROMOLECULE MODIFICATION	-5
6,5:1	1,2:1	0,8:1	CELLULAR CATABOLIC PROCESS	
5,8:1	1,6:1	1,1:1	CELLULAR METABOLIC PROCESS	
7,0:1	2,4:1	1,7:1	CELL PROJECTION ORGANIZATION	
	2,3:1	1,7:1	CELLULAR COMPONENT MORPHOGENESIS	
	2,5:1	1,8:1	CELL MORPHOGENESIS	
7,7:1	1,3:1	1,0:1	CELLULAR LOCALIZATION	
5,9:1	1,3:1	1,0:1	CELL CYCLE	
7,6:1	0,9:1	0,7:1	INTRACELLULAR TRANSPORT	
	2,9:1	2,1:1	ANATOMICAL STRUCTURE MORPHOGENESIS	
7,2:1	1,2:1	0,9:1	MACROMOLECULE LOCALIZATION	
6,4:1	1,9:1	1,5:1	CYTOSKELETON ORGANIZATION	
	2,8:1	1,9:1	NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	
5,6:1	1,6:1	1,1:1	CELLULAR RESPONSE TO STRESS	
	2,9:1	2,0:1	NEUROGENESIS	
	3,3:1	2,1:1	CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN NEURON DIFFERENTIATION	
328	486	655	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p < 1 \cdot 10^{-2}$)	

Die am häufigsten durch die siebentägige Östradiolbehandlung veränderten biologischen Prozesse waren, wie nach eintägiger Behandlung, metabolischer, katabolischer und neuronaler Natur (Tab. 4.20). Jedoch resultierten im Gegensatz zur eintägigen Behandlung für die metabolischen, wie auch katabolischen Prozesse keine deutlichen Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Neuronale Prozesse hingegen waren wiederum nur bei den Gruppen 7Tage-Ö₂50 und 7Tage-Ö₂100 nachzuweisen, was eine altersspezifische Hormonsensitivität der Altersstadien nahelegte. Zudem waren die detektierten neuronalen Prozesse stärker durch positiv regulierte Gene vertreten, als die übrigen Prozesse.

Tab. 4.20. Metabolische, katabolische und neuronale Prozesse, die in den verschiedenen behandelten Altersstadien relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert waren ($p < 1 \cdot 10^{-5}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100		
Metabolische Prozesse				
7,2:1	1,6:1	1,0:1	PROTEIN METABOLIC PROCESS	-15
5,9:1	1,7:1	1,2:1	PRIMARY METABOLIC PROCESS	-12
7,0:1	1,9:1	1,1:1	PHOSPHATE-CONTAINING COMPOUND METABOLIC PROCESS	-9
5,9:1	1,7:1	1,2:1	SMALL MOLECULE METABOLIC PROCESS	-6
6,3:1	0,9:1	0,6:1	MRNA METABOLIC PROCESS	-3
7,6:1	1,5:1	1,1:1	NUCLEOBASE-CONTAINING SMALL MOLECULE METABOLIC PROCESS	0
7,8:1	1,1:1	0,8:1	NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE METABOLIC PROCESS	
4,6:1	1,9:1	1,2:1	CELLULAR LIPID METABOLIC PROCESS	
6,9:1	1,6:1	1,1:1	HETEROCYCLE METABOLIC PROCESS	
4,4:1	1,7:1	1,2:1	CARBOXYLIC ACID METABOLIC PROCESS	
4,4:1	1,7:1	1,2:1	OXOACID METABOLIC PROCESS	
4,5:1	1,8:1	1,2:1	CELLULAR KETONE METABOLIC PROCESS	
Katabolische Prozesse				
9,4:1	0,8:1	0,6:1	MACROMOLECULE CATABOLIC PROCESS	
7,9:1	1,2:1	0,9:1	PURINE NUCLEOTIDE CATABOLIC PROCESS	
8,8:1	1,4:1	1,0:1	HETEROCYCLE CATABOLIC PROCESS	
8,9:1	1,4:1	1,0:1	CELLULAR NITROGEN COMPOUND CATABOLIC PROCESS	
	1,2:1	0,8:1	REGULATION OF GTP CATABOLIC PROCESS	
10,3:1	0,8:1	0,5:1	MODIFICATION-DEPENDENT MACROMOLECULE CATABOLIC PROCESS	
10,5:1	0,8:1	0,5:1	PROTEOLYSIS INVOLVED IN CELLULAR PROTEIN CATABOLIC PROCESS	
10,7:1	0,8:1	0,5:1	UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN CATABOLIC PROCESS	
	1,0:1	0,9:1	ATP CATABOLIC PROCESS	
6,5:1	1,2:1	0,8:1	CELLULAR PROTEIN CATABOLIC PROCESS	
Neuronale Prozesse				
	3,1:1	2,0:1	NEURON PROJECTION DEVELOPMENT	
	3,2:1	2,1:1	NEURON DEVELOPMENT	
	2,9:1	2,0:1	NEUROGENESIS	
	3,3:1	2,1:1	CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN NEURON DIFFERENTIATION	
6,4:1	3,5:1	2,2:1	AXON GUIDANCE	

4.2.3. Effekt der Behandlungsdauer auf die Richtung der Expressionsveränderung

In den beiden vorausgehenden Kapiteln hatte ich gezeigt, dass nach ein- wie nach siebentägiger Behandlung mit Östradiol die ältesten Versuchsgruppen eine stärkere Sensitivität aufwiesen. Dagegen war die Richtung der Genexpressionsveränderung im HVC von der Behandlungsdauer abhängig. So wurden einige Gene durch Östradiol nach einem Tag zunächst inhibiert (26,0% aller nach ein oder siebentägiger Hormongabe signifikant regulierten Gene) oder stimuliert (5,0% aller nach ein oder siebentägiger Hormongabe signifikant regulierten Gene), reagierten aber nach sieben Tagen durch eine gegenläufige Expressionsänderung (Abb. 4.8, lila Schnittmengen). Die Regulation der in diesen Schnittmengen enthaltenen Gene schien damit neben Östradiol auch homöostatisch wirksamen Faktoren zu unterliegen. Der konkrete Einfluss derartiger Faktoren auf die Änderungen des Genexpressionslevels im HVC nach einer Östradiolgabe war nicht bekannt. Die Wirkungsweise von Östradiol auf die Expression von Genen, die unabhängig von der Behandlungsdauer signifikant reguliert und durch eine einheitliche Richtung der Expressionsveränderung charakterisiert waren, erschien vergleichsweise weniger komplex. Für diese Analyse wurden die beide jüngsten behandelten Stadien, 1Tag-Ö₂-19 und 7Tage-Ö₂-25 zusammengefasst, obgleich sich in der Entwicklung zwischen ENTW-19 und ENTW-25 ein deutlicher Bruch in der Genexpression abzeichnete (vgl. Abb. 4.2) und die Korrelationsanalyse einen vergleichbaren Wert für die Ähnlichkeit für die Paare ENTW19/ENTW-25 und ENTW-25/ENTW-50 aufwies.

Eine Beschränkung der Analyse auf diese Gene hatte nur einen geringen Einfluss auf die Arten biologischer Prozesse, die als überrepräsentierte detektiert werden konnten. Dies galt für die eintägige (vgl. Tab. 4.15 mit Tab. 4.21), wie die siebentägige Östradiolbehandlung (vgl. Tab. 4.19 mit Tab. 4.22). Ausnahmen, bei denen die Signifikanz in Relation zu den anderen biologischen Prozessen erhöht war, bildeten unabhängig von der Behandlungsdauer hauptsächlich Stoffwechselvorgänge phosphathaltiger Moleküle, sowie nach der Eintagesbehandlung Ciliummorphogenese und Katabolismus stickstoffhaltiger Komponenten, und schließlich nach der Siebentagebehandlung die Lokalisation von Proteinen und der Metabolismus von mRNA. Insgesamt betrachtet entsprach aber diese Gruppe von Genen hinsichtlich der betroffenen biologischen Prozesse zum großen Teil der Gruppe aller in der Expression veränderten Gene.

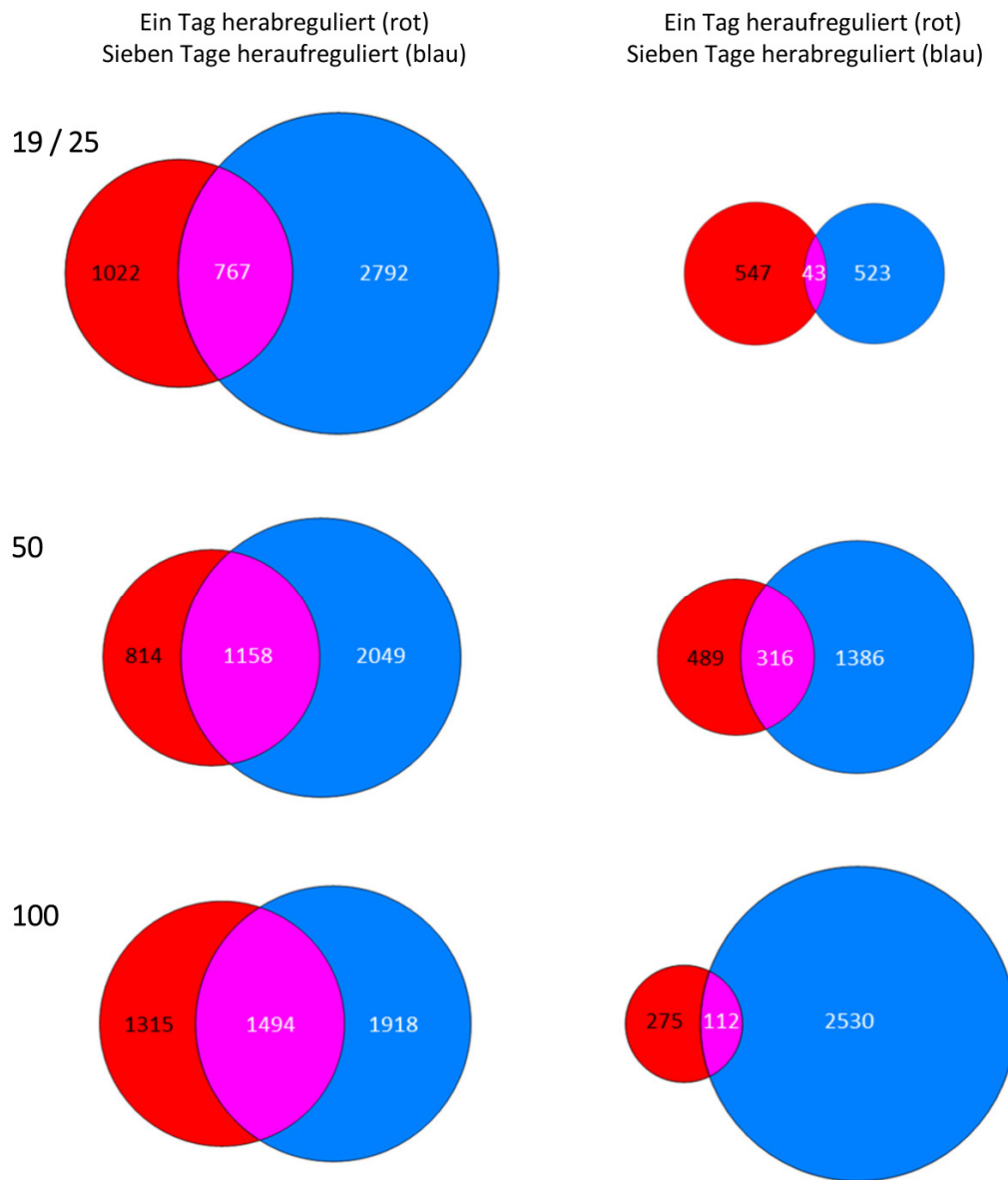


Abb. 4.8. Schnittmengen der Gene der drei Östradiol-behandelten Altersstadien (19/25, 50 und 100 Tage nach dem Schlupf), deren Expressionsveränderung im HVC in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer gegensätzlich verlief (relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe). In Rot dargestellt wurden alle Gene, die nach eintägiger, in Blau alle Gene die nach siebentägiger Behandlung unterschiedlich exprimiert waren. Die linke Spalte enthält alle Gene, welche nach eintägiger Behandlung herab und nach siebentägiger Behandlung heraufreguliert waren. Die rechten Spalte enthält alle Gene, die nach eintägiger Behandlung herauf- und nach siebentägiger Östradiolgabe herabreguliert waren. In lila sind somit alle Gene dargestellt, die infolge der unterschiedlichen Dauer der Hormonbehandlung eine gegenläufige Expression aufwiesen.

Tab. 4.21. Analyse der im HVC nach eintägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe am stärksten signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse, welche keine gegenläufige Expression infolge der Behandlungsdauer aufweisen. Dargestellt sind signifikante Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$) und die Gesamtanzahl ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

1Tag-Ö ₂ -19	1Tag-Ö ₂ -50	1Tag-Ö ₂ -100		
1:2,0	1:2,0	1:3,6	TRANSMEMBRANE TRANSPORT	-9
1:1,7	1:1,7	1:4,1	PHOSPHATE-CONTAINING COMPOUND METABOLIC PROCESS	-8
1:1,8	1:2,0	1:4,3	ORGANELLE ORGANIZATION	-7
	1:1,8	1:4,2	CELL CYCLE	-6
	1:0,7	1:0,6	SINGLE-ORGANISM PROCESS	-5
1:2,0	1:1,7	1:2,1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-4
1:1,6	1:1,6	1:5,4	PROTEIN MODIFICATION PROCESS	
	1:1,6	1:20,1	CELLULAR PROTEIN METABOLIC PROCESS	
	1:2,1	1:2,9	ORGANONITROGEN COMPOUND CATABOLIC PROCESS	
	1:1,7	1:4,0	ORGANOPHOSPHATE CATABOLIC PROCESS	
1:1,4	1:2,9	1:3,0	CILIUM MORPHOGENESIS	
	1:2,1	1:8,0	REGULATION OF RAS PROTEIN SIGNAL TRANSDUCTION	
	1:1,7	1:3,9	NUCLEOTIDE CATABOLIC PROCESS	
	1:2,1	1:6,9	REGULATION OF SMALL GTPASE MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION	
1:1,5	1:3,6	1:5,0	CELL PROJECTION ASSEMBLY	
	1:2,1	1:3,3	ESTABLISHMENT OF LOCALIZATION	
	1:2,2	1:5,5	RAS PROTEIN SIGNAL TRANSDUCTION	
	1:1,8	1:3,8	MICROTUBULE-BASED PROCESS	
1:4,3		1:4,1	EXTRACELLULAR MATRIX ORGANIZATION	
1:1,8	1:4,0		ESTABLISHMENT OF ORGANELLE LOCALIZATION	
202	267	257	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$)	

Tab. 4.22. Analyse der im HVC nach siebentägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe am stärksten signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse, welche keine gegenläufige Expression infolge der Behandlungsdauer aufweisen. Dargestellt sind signifikante Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$) und die Gesamtanzahl ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100		
4,6:1	1,2:1	0,7:1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-25
6,2:1	1,1:1	0,6:1	ORGANELLE ORGANIZATION	-20
6,1:1	0,9:1	0,5:1	INTRACELLULAR TRANSPORT	-15
5,2:1	0,9:1	0,6:1	MACROMOLECULE LOCALIZATION	-10
5,9:1	1,3:1	0,6:1	PHOSPHORUS METABOLIC PROCESS	-5
5,3:1	1,0:1	0,5:1	CELLULAR CATABOLIC PROCESS	0
5,4:1	1,1:1	0,6:1	CELLULAR PROTEIN METABOLIC PROCESS	
5,0:1	1,1:1	0,5:1	ORGANIC SUBSTANCE CATABOLIC PROCESS	
6,6:1	0,7:1	0,5:1	ESTABLISHMENT OF PROTEIN LOCALIZATION	
6,7:1	0,8:1	0,5:1	MACROMOLECULE CATABOLIC PROCESS	
5,1:1	1,3:1	0,6:1	PROTEIN MODIFICATION PROCESS	
4,9:1	0,8:1	0,5:1	CELLULAR MACROMOLECULE CATABOLIC PROCESS	
5,0:1	1,4:1	0,7:1	MACROMOLECULE MODIFICATION	
6,3:1	0,8:1	0,5:1	PROTEIN TRANSPORT	
5,5:1	0,8:1	0,4:1	MRNA METABOLIC PROCESS	
5,3:1	1,2:1	0,6:1	CELL CYCLE	
	1,3:1	0,8:1	CELLULAR COMPONENT MORPHOGENESIS	
	0,8:1	0,5:1	NUCLEOBASE-CONTAINING COMPOUND CATABOLIC PROCESS	
6,6:1	1,1:1	0,5:1	ORGANOPHOSPHATE METABOLIC PROCESS	
5,2:1	1,4:1	0,9:1	CELL PROJECTION ORGANIZATION	
5,2:1	1,3:1	0,6:1	SMALL MOLECULE METABOLIC PROCESS	
286	451	593	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$)	

Eine detailliertere Analyse der in Tabelle 4.22 angeführten Prozesse, ergab eine verstärkte Überrepräsentation neuronaler Prozesse (Tab. 4.23), wobei diese hauptsächlich bei den beiden ältesten Gruppen detektiert werden konnten. Die Verhältnisse der herauf zu herabregulierten Gene entsprachen für 7Tage-Ö₂-25 und 7Tage-Ö₂-100 den Werten, die bereits für alle nicht gegenläufig regulierten Gene detektiert werden konnten (Tab. 4.22). Für die älteste Gruppe konnte jedoch ein stärkerer Aktivierungseffekt bei den neuronalen Prozessen festgestellt werden (Tab. 4.23). Bei der jüngsten untersuchten Gruppe war der Prozess „*Neuron development*“ signifikant überrepräsentiert und durch deutlich mehr herauf, als herabregulierte Gene vertreten. Dies deutete möglicherweise auf entwicklungsbeschleunigende Effekte infolge östrogenen Behandlung in der frühen Gesangslerphase hin.

Tab. 4.23. Analyse der im HVC nach siebentägiger Östradiolbehandlung relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe am stärksten signifikant überrepräsentierten neuronalen Prozesse, welche keine gegenläufige Expression infolge der Behandlungsdauer aufweisen. Dargestellt sind alle signifikante Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.

	7Tage-Ö ₂ -25	7Tage-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -100		
	1,8:1	1,1:1	1,1:1	NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	-8
4,4:1	1,8:1	1,1:1	1,1:1	NEURON DEVELOPMENT	-7
	1,6:1	1,0:1	1,0:1	NEURON PROJECTION DEVELOPMENT	-6
	1,8:1	1,1:1	1,1:1	NEUROGENESIS	-5
	1,7:1	1,1:1	1,1:1	CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN DIFFERENTIATION	-4
	1,8:1	1,1:1	1,1:1	NEURON DIFFERENTIATION	-3
		1,1:1	1,1:1	TELENCEPHALON DEVELOPMENT	
	1,9:1	1,1:1	1,1:1	REGULATION OF NEURON PROJECTION DEVELOPMENT	

4.2.4. Positive oder negative Rückkopplung nach Östradiolgabe

Der Eingriff in den Hormonhaushalt durch die Gabe von Östradiol kann eine Veränderung der physiologischen Vorgänge im Organismus induzieren. Diese Effekte können durch die Regulation des Rezeptors, der endogenen Hormonsynthese und der für die transkriptiven Aktivität unerlässlichen Coregulatoren modifiziert werden.

Das östradiolsynthetisierende Hormon „*Aromatase*“ (*CYP19A1*, *AROM*) wird in zahlreichen Arealen des Gesangsystems, so auch im caudomedialen Bereich des HVC entwicklungsabhängig exprimiert (Jacobs et al., 1999; Tam & Schlinger, 2007; Schlinger & Ramage-Healey, 2012). Gegenüber den adulten Kontrolltieren war *AROM* in allen fünf Stadien durchgehend herabreguliert (Tab. 4.24). Das östradiolkatabolisierende Enzym „*Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase*“ (*HSD17B4*) wurde hingegen sowohl alters-, als auch hormonbedingt unterschiedlich reguliert. Dies deutet zum einen auf eine altersbedingte Regulation des Hormontiters hin.

Auf der Ebene des Rezeptors fand in der frühen Entwicklungsstudie eine Angleichung der Expression von *ER-α* auf das adulte Niveau statt (Tab. 4.24). Zudem konnte eine Herabregulation für *ER-β* in allen Entwicklungsgruppen detektiert werden, obgleich ein Nachweis für diesen Rezeptor bislang nicht erbracht werden konnte (Jacobs et al., 1996). Für beide Rezeptoren führte nur die langfristige Östradiolgabe bei beiden älteren Gruppen zu einer erhöhten Expression. Der Androgenrezeptor hingegen wies nur bei ENTW-25 eine Reduktion und bei 7Tage-Ö₂-100 eine Zunahme der Expression auf. Infolge der eintägigen Östradiolgabe wurden *AROM* bei 100 Tage

alten Tieren herab, nach siebentägiger Hormonbehandlung bei 50 Tagen alten Zebrafinken heraufreguliert (Tab. 4.24).

Tab. 4.24. Expression der relativ zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe detektierten Geschlechtshormonrezeptoren („*Estrogen receptor alpha*“ (ER- α), „*Estrogen receptor beta*“ (ER- β) und „*Androgenrezeptor*“ (AR)), des östradiolsynthetisierenden Hormons „*Aromatase*“ (CYP19A1/AROM) und des östradiolkatabolisierenden Enzyms „*Hydroxysteroid-(17-beta)-dehydrogenase-4*“ (HSD17B4), sowie zahlreicher Steroidhormonrezeptorcoregulatoren im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung (ENTW-), sowie nach eintägiger (1Tag-Ö₂-), wie auch siebentägiger (7Tage-Ö₂-) Östradiolbehandlung. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Im Gegensatz zu allen folgenden Abbildungen wurde der Expressionsunterschied nach Hormongabe relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen angegeben.

	Entwicklung					Ein Tag Ö ₂			Sieben Tage Ö ₂		
	19	25	30	50	100	19	50	100	25	50	100
Östradiolmetabolismus											
CYP19A1	3	2,5	2	2	2	1	1	0,67	2	1,5	1
HSD17B4	0,5	0,5	0,5	1	0,33	1	1	1	0,5	0,5	0,33
Rezeptoren											
ER- α / ESR1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
ER- β / ESR2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2	2
AR	1	0,5	1	1	1	1	1	1	2	2	2
Coregulatoren											
CREBBP	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	2	2
HDAC1	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	2	2
NCOA1 / SRC1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,5
NCOA2 / SRC2	0,5	0,5	0,5	2	2	1	1	1	0,5	0,5	0,5
NCOA5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NCOA7	1	0,5	0,5	2	2	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NCOR1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	2	2
NCOR2	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	2	2	2
RPL7	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5
TRAP1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	2	2	2

Die Interaktion von Coregulatoren beeinflusst den hormonellen Einfluss auf die Genregulation grundlegend, da sie abhängig von der Zusammensetzung fördernd oder inhibierend wirken können (Cavarretta et al., 2002; McKenna et al., 1999). Darüber hinaus ist die Funktion der Coregulatoren stark gewebsspezifisch (Misiti et al., 1998), und trägt zur Ausprägung

sexualdimorpher Gehirnnareale bei (Hsiao et al., 1999). Im Zebrafinken wurde die Funktion der Coaktivatoren „*Ribosomal protein 7*“ (*RPL7*), „*CREB binding protein*“ (*CREBBP*) (Duncan et al., 2009; für Übersichtsartikel siehe: Duncan & Carruth, 2011) und *SRC1* (Duncan et al., 2010) detaillierter untersucht. Ein *knockdown* von *RPL7* in der frühen postovalen Entwicklung veränderte zwar die Morphologie von HVC und AreaX (Volumen und Zellgröße), wirkt sich aber nicht negativ auf das Gesangslernen und den Adultgesang aus (Duncan & Carruth, 2011). In der frühen sensorischen Phase wurde *RPL7* zunächst herabreguliert, erreichte von 30 bis 50 Tagen das Expressionsniveau adulter Tiere und fiel bei 100 Tagen wieder ab. (Tab. 4.24). Infolge der eintägigen Hormonbehandlung wurde *RPL7* als einziger Coregulator heraufreguliert und entgegen dem Trend, wie *NCOA2* und -7, nach siebentägiger Behandlung herabreguliert.

4.2.5. Östrogeneffekte auf das Transkriptom des HVC

Ein zentraler Punkt dieser Studie umfasste die Frage, ob Östradiol die altersabhängige Reifung des Transkriptoms des HVC verlangsamen bzw. beschleunigen kann. Um Aussagen hinsichtlich derartiger östrogenen Effekte treffen zu können, bedurfte es der Bestimmung eines Expressionswerts, der auf ein und dieselbe Kontrollgruppe bezogen wurde. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Analysen die Expressionswerte der mit Östradiol behandelten Gruppen nicht auf Basis der gleichaltrigen, unbehandelten Kontrollgruppen ermittelt, sondern gegenüber den adulten Zebrafinken („ADULT“), welche bereits in der Entwicklungsstudie als Referenz fungierten.

Zur Analyse des hormonellen Effekts auf das gesamte Transkriptom im HVC wurden sämtliche Gruppen anhand eines Dendrogramms geclustert. Hierzu wurde die Ähnlichkeit der Gruppen zueinander unter Zuhilfenahme der errechneten Expressionsunterschiede gegenüber der Kontrollgruppe („ADULT“) ermittelt. Als Methode kam die Berechnung des Euklidischen Abstands zur Anwendung. Die Ergebnisse sind anhand eines Dendrogramms (Abb. 4.9) dargestellt.

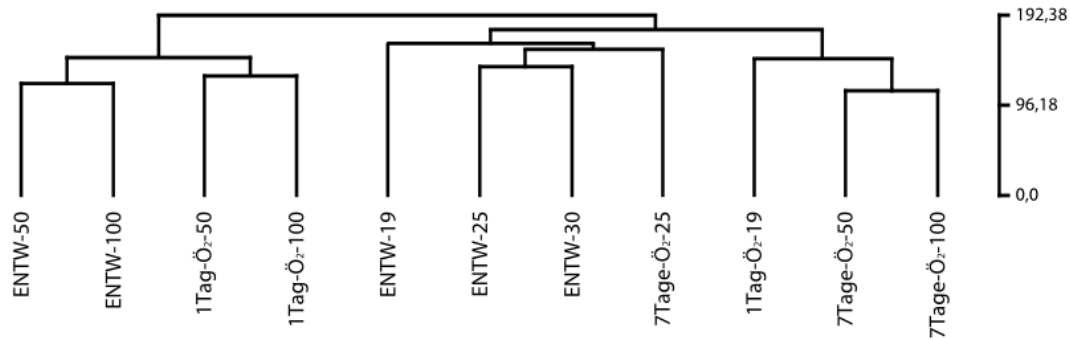


Abb. 4.9. Vergleich des Transkriptoms der HVCs der Entwicklungsgruppen (ENTW-19,-25,-30,-50,-100) und aller für einen (1Tag-Ö₂-19,-50,-100) und für sieben (7Tage-Ö₂-25,-50,-100 Tage) mit Östradiol behandelten Gruppen in Relation zu den Adulten anhand eines Dendrogramms. Dargestellt ist das Ergebnis einer hierarchischen Gruppierung aller signifikant regulierten Gene (Euklid'sche Abstandsberechnung, Methode: Bestimmung des kleinsten mittleren Abstands (*average linkage*)). Je dichter zwei Behandlungsgruppen auf horizontaler Ebene beieinander liegen, desto ähnlicher fiel die Genexpression in diesen Gruppen aus. Verdeutlicht wird dies zusätzlich durch die graphische Darstellung des Dendrogramms, wobei ein Wert von „0“ eine vollkommene Ähnlichkeit, der Wert von 192,38 die maximal detektierte Diskrepanz zwischen zwei Gruppen darstellte. Während beide Behandlungsregime bei den jüngeren, sowie die eintägige Behandlung bei beiden älteren Gruppen zu keiner Angleichung des Transkriptoms in Richtung einer nicht gleichaltrigen Gruppe führten, deutete das Transkriptom der 50 und 100 Tage alten Zebrafinken nach siebentägiger Behandlung auf einen juvenilisierenden Effekt der Hormongabe hin. Verglichen wurden die fünf Entwicklungsgruppen ENTW-19, ENTW-25, ENTW-30, ENTW-50 und ENTW-100, sowie alle für einen (1Tag-Ö₂-19,-50,-100), wie auch für sieben Tage mit Östradiol behandelten Gruppen (7Tage-Ö₂-25,-50,-100).

Sowohl die kurz-, wie auch die langzeitige Östradiolbehandlung induzierte altersabhängige Unterschiede. So waren sich die beiden ältesten Gruppen (50 und 100 Tage alte Zebrafinken) unabhängig vom Behandlungsregime jeweils ähnlicher als gegenüber den jüngsten untersuchten Gruppen. Bemerkenswert war zudem, dass die jüngsten mit Östradiol behandelten (1Tag-Ö₂-19 und 7Tage-Ö₂-25) Zebrafinken keiner unbehandelten älteren oder jüngeren Gruppe ähnlicher waren als der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Dies würde bedeuten, dass die ein- und siebentägige Östradiolbehandlung in der frühen untersuchten Gesangslernphase keinen maturierenden Effekt auf das gesamte Transkriptom hätte. Im Gegensatz hatte die siebentägige Behandlung mit Östradiol bei 50 und 100 Tage alten Zebrafinken zur Folge, dass ihr Transkriptom eher den Juvenilstadien glich als den gleichaltrigen Tieren, die einen Tag mit Östradiol implantiert oder unbehandelt waren. Dies spräche dafür, dass die langzeitige Östradiolgabe bei den beiden ältesten Gruppen eine Juvenilisierung des Transkriptoms auslöste. Überraschend deutlich war darüber hinaus die hohe Ähnlichkeit der beiden ältesten Gruppen (Siebentagesbehandlung) mit den Zebrafinken der Gruppe 1Tag-Ö₂-19. Dies könnte bedeuten, dass spezifische Prozesse durch die Hormongabe inhibiert oder forciert wurden. Für eine weiterführende Analyse der möglicherweise betroffenen neuronalen Eigenschaften des HVC, wurden daher alle detektierten Neurotransmitter detaillierter analysiert.

4.2.6. Östrogeneffekte auf die Expression von Neurotransmitterrezeptoren

Neurotransmitterrezeptoren rekrutieren sich aus unterschiedlichen Untereinheiten, wobei die Zusammensetzung die Rezeptorphysiologie definiert (für Übersichtsartikel siehe: Wyllie et al., 2013; Gassmann & Bettler, 2012; Sieghart & Sperk, 2002;). Die detektierten Neurotransmitterrezeptoruntereinheiten reagierten alters- und entwicklungsspezifisch auf die Gabe von Östradiol, wobei die physiologische Konsequenz dieser Veränderungen weiterführender Analysen bedarf.

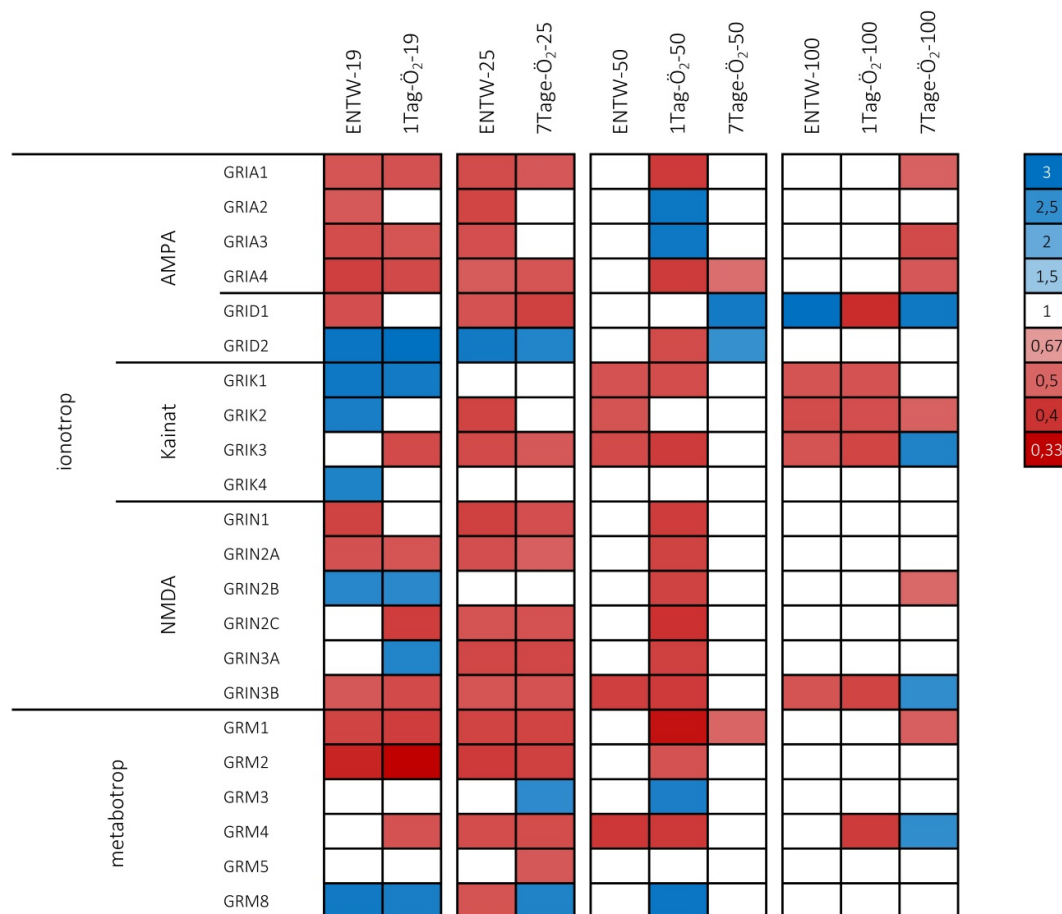
4.2.6.1. Veränderungen des Entwicklungsmusters

Für diese Analyse wurden zuerst Gene betrachtet, die für Neurotransmitterrezeptoren codieren, da über ihr Entwicklungsprofil in der vorliegenden Studie bereits Erkenntnisse gesammelt wurden (siehe Kapitel 4.1.7). Somit lagen gegebenenfalls Informationen über Entwicklungstrends, deren Umkehrung oder Verstärkung nach einer Östradiolbehandlung untersucht werden konnte. Auf die siebentägige Östradiolbehandlung wird im Folgenden für jene Gene eingegangen, bei denen Veränderungen des Reifungsprozesses in mehr als nur einer Altersgruppe zu beobachten waren, weil damit eine Umkehrung oder Verstärkung der Expressionstrends am auffälligsten war.

Unter den Glutamaterezeptoren reagierten der NMDA-Rezeptor *GRIA4* und der Kainatrezeptoruntereinheit *GRIK1* bei den beiden Gruppen 7Tage-Ö₂-50 und 7Tage-Ö₂-100 mit einer Angleichung an das Expressionsniveau jüngerer Altersstadien (Tab. 4.25). Auch bei den GABA-Rezeptoren traten vergleichbare Expressionsveränderungen für die GABAA-Rezeptor Untereinheiten *GABRA2*, *GABRA3*, *GABRB2* und *GABRG3* auf (Tab. 4.26). Dagegen verstärkte Östradiol den Reifungsgrad der Expression beim GABAA-Rezeptor *GABRP* und dem GABAC-Rezeptor *GABRR3*. Es ließ sich damit festhalten, dass Östradiol bei mehr GABA- als Glutamat-Rezeptoren, bei denen die Änderung des Expressionsmusters eine eindeutige Richtung hatte, nach siebentägiger Behandlung eine Verjüngung des Expressionsniveaus verursachte.

Eine verminderte Reifung des Expressionsniveaus durch die Siebentagesbehandlung mit Östradiol konnte bei den beiden älteren Gruppen auch für den Dopaminrezeptor *DRD4*, sowie die Serotoninrezeptoren *HTR2A*, *HTR2B*, *HTR3A* und *HTR7* detektiert werden. Der adrenerge *ADRA1B* Rezeptor reagierte in ähnlicher Weise, allerdings wurde der Effekt bereits in der Gruppe 7d-Ö₂-25 sichtbar (Tab. 4.27).

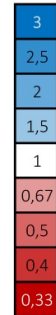
Tab. 4.25. Expression aller relativ zu den adulten Tieren detektierten Glutamatrezeptoren im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung (ENTW-), sowie nach eintägiger (1Tag-Ö₂-), wie auch siebentägiger (7Tage-Ö₂-) Östradiolbehandlung. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.



Neben einer Umkehrung des Entwicklungstrends ließ sich bei einigen anderen Genen ein Reifungseffekt von Östradiol detektieren. So führte Östradiol unabhängig von der Behandlungsdauer beim Gen *DRD1*, welcher im neuronalen System des Säugers aktivierend wirkt (Gerfen, 2000; für Übersichtsartikel siehe: Beaulieu & Gainetdinov, 2011), grundsätzlich zu einer Senkung der Expressionsstärke auf das Level der adulten Kontrolltiere (Tab. 4.27). Die Zunahme der Expression des Glutamatrezeptors *GRID1* im Alter von 25 bis 100 Tagen wird durch Östradiol in der Gruppe 7Tage-Ö₂-50 verstärkt (Tab. 4.25). Ein vergleichbarer Effekt war bei den beiden älteren Gruppen für die GABA-Rezeptoren *GABPR* und *GABRR3* zu detektieren (Tab. 4.26). Damit konnte festgestellt werden, das Östradiol die Entwicklung des Expressionsniveaus von Neurotransmitterrezeptoren sowohl verlangsamen als auch beschleunigen kann.

Tab. 4.26. Expression relativ zu den adulten Tieren aller detektierten GABA- und Glycinrezeptoren, sowie der Glutamatdecarboxylasen *GAD1* und *GAD2* im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung (ENTW-), sowie nach eintägiger (1Tag-Ö₂-), wie auch siebentägiger (7Tage-Ö₂-) Östradiolbehandlung. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.

		ENTW-19	1Tag-Ö ₂ -19	ENTW-25	7Tage-Ö ₂ -25	ENTW-50	1Tag-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -50	ENTW-100	1Tag-Ö ₂ -100	7Tage-Ö ₂ -100
GABA	GABRA1										
	GABRA2										
	GABRA3										
	GABRA4										
	GABRA5										
	GABRA6										
	GABRB1										
	GABRB2										
	GABRD										
	GABRE										
	GABRG1										
	GABRG2										
	GABRG3										
	GABRP										
	GABRQ										
	GABRR1										
	GABRR2										
	GABRR3										
	GAD1										
	GAD2										
Glycin	GLRA1										
	GLRA2										
	GLRA3										
	GLRA4										



4.2.6.2. Einfluss von Alter und Behandlungsdauer

Nach eintägiger Östradiolgabe konnte bei den Genen codierend für Glutamatrezeptoruntereinheiten eine deutliche Heterogenität bezüglich der östradiolabhängigen Effekte in den drei behandelten Altersstadien festgestellt werden (Tab. 4.25) Auf diese Behandlung reagierte die Gruppe 1Tage-Ö₂-100 mit der geringsten Veränderung. So waren nur zwei Rezeptoruntereinheiten (*GRID1*, *GRM4*) in der Expression gegenüber den unbehandelten adulten Vögeln verändert. Den vergleichsweise stärksten Effekt zeigte das

Stadium der 50 Tage alten Zebrafinken. Hier führte die Eintagesbehandlung zur Herabregulation von zehn Untereinheiten, während fünf verstärkt exprimiert wurden. Abgesehen von *GRIN3B* wurden alle NMDA-Untereinheiten in dieser Altersgruppe nach eintägiger Behandlung in ihrer Expression inhibiert, erreichten aber nach siebentägiger Behandlung wieder das altersgemäße Expressionsniveau. Daneben waren in dieser Altersgruppe außer *GRID1* alle detektierten AMPA-Rezeptoren von der Eintagesbehandlung betroffen, wenn auch mit uneinheitlicher Richtung der Expressionsveränderung. Analog zur Situation der NMDA-Rezeptoren führte die längere Östradiolpräsenz im Rahmen der Siebentagesbehandlung bei den Untereinheiten *GRIA1*, 2 und 3 zu einem altersgemäßen Expressionsniveau. Gleichsam war in der Gruppe 1Tag-Ö₂-50 die Expression von fünf der sechs metabotropen Glutamatrezeptoren verändert (Tab. 4.25).

Wie bei den Glutamatrezeptoren ließ sich auch bei GABA-Rezeptoren ein deutlicher Altersunterschied nach der eintägigen Östradiolbehandlung feststellen (Tab. 4.26). Während den Veränderungen der GABA-Rezeptorexpression beim jüngsten Altersstadium mehrheitlich eine Stimulation der Expression zu Grunde lag, gingen diese in der Gruppe 1Tag-Ö₂-100 ausschließlich auf Inhibitionen zurück (Tab. 4.26).

Im Gegensatz zur Eintagesbehandlung zeigte der Anteil an Genen für Glutamatrezeptoren, deren Expression sich infolge der siebentägigen Östradiolbehandlung veränderte, kaum Altersunterschiede. Dagegen waren relativ mehr GABA-Rezeptoren bei den beiden älteren Altersgruppen von dieser Behandlung betroffen (28% für 7 Tage Ö₂-25-, 67% für 7 Tage Ö₂-50- und 61% für 7 Tage Ö₂-100). Gleiches galt für das Enzym *GAD1* („*Glutamate decarboxylase 1*“) auf, das den finalen Schritt der GABA-Synthese katalysiert.

Tab. 4.27. Expression relativ zu den adulten Tieren aller detektierten Dopamin-, Glycin-, und Serotoninrezeptoren, sowie der Enzyme Dopamin- β -hydroxylase (DBH; Noradrenalsynthese) und Tyrosinhydroxylase (TH; Dopaminsynthese) im HVC männlicher Zebrafinken während der Entwicklung (ENTW-), sowie nach ein- (1Tag-1Ö₂-), wie auch siebentägiger (7Tage-Ö₂-) Östradiolbehandlung. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.

		ENTW-19	1Tag-Ö ₂ -19	ENTW-25	7Tage-Ö ₂ -25	ENTW-50	1Tag-Ö ₂ -50	7Tage-Ö ₂ -50	ENTW-100	1Tag-Ö ₂ -100	7Tage-Ö ₂ -100
Dopamin	DRD1	3	1	3	1	3	1	1	3	1	1
	DRD2	0,67	0,67	0,67	0,67	1	0,67	1	1	1	1
	DRD3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1
	DRD4	0,67	1	1	0,67	0,67	0,67	1	0,67	0,67	1
	DRD5	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
Serotonin	HTR1A	1	1	0,67	1	1	1	1	1	1	1
	HTR2A	0,67	0,67	0,67	0,67	1	1	0,67	1	1	0,67
	HTR2B	0,67	0,67	0,67	1	1	1	0,67	1	1	0,67
	HTR2C	0,67	1	0,67	1	1	1	1	1	1	0,67
	HTR3A	1	1	0,67	0,67	0,67	0,67	1	0,67	0,67	3
	HTR4	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	1
	HTR7	1	1	0,67	1	0,67	1	1	0,67	1	1
Nor-/ Adrenalin	ADRA1B	1	1	0,67	1	0,67	1	1	1	1	0,67
	ADRA1D	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Enzyme	DBH	1	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	1	0,67	0,67	3
	TH	1	1	0,67	0,67	0,67	3	1	0,67	0,67	3

4.2.6.3. Rezeptortyp-spezifische Östradioleffekte

Ionotropische Glutamaterezeptoren unterschieden sich in ihrer Sensitivität gegenüber der Siebentagesbehandlung mit Östradiol (Tab. 4.25). Während nur wenige NMDA-Untereinheiten mit einer Veränderung reagierten (*GRIN3B* in der Gruppe 7Tage-Ö₂-50; *Grin2B* in der Gruppe 7Tage-Ö₂-100), war der Anteil der betroffenen AMPA- und insbesondere der Kainatrezeptoren deutlich größer. So stimulierte Östradiol drei der vier detektierten Kainatrezeptoren in der Gruppe 7Tage-Ö₂-50 (*GRIK1*, *GRIK2* und *GRIK3*), und zwei davon in der Gruppe 7Tage-Ö₂-100 (*GRIK1* und *GRIK3*).

Während bei den Dopaminrezeptoren hauptsächlich nur zwei der fünf detektierten Gene auf Östradiol reagierten, veränderte sich in der Gruppe 7Tage-Ö₂-100 die Expression von sechs der sieben detektierten Gene für Serotoninrezeptoren (Tab. 4.27).

4.2.7. Östrogeneffekte auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

Wachstumsfaktoren können bei Säugetieren die Rolle von Mediatoren östrogenen Aktivität übernehmen, so wie bei der Entstehung von Tumoren (Schiff et al., 2004; Pattarozzi et al., 2008; Ribeiro & Freiman, 2014) und im Rahmen neuroprotektiver Funktionen (Strom et al., 2011; Singh & Su, 2013; Sohrabji & Williams, 2013; Karki et al., 2014). Bei juvenilen Zebrafinkenmännchen stimuliert systemisch appliziertes Östradiol die Expression des Neurotrophins *BDNF* im HVC (Dittrich et al., 1999), und bei kultivierten Endothelzellen aus der HVC-Region des Kanarienvogels verursacht Östrogen eine verstärkte Expression von *BDNF* und des VEGF-Rezeptors *KDR* (Louissaint et al., 2002). Um in dieser Studie Östradioleffekte auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren im HVC zwischen den verschiedenen Altersstadien vergleichen zu können, wurden bei der Datenanalyse erneut die adulten Vögel als Kontrollgruppe verwendet, analog zum Vorgehen in Kapitel 4.2.4.

4.2.7.1. Effekte auf Wachstumsfaktoren kanonischer Signalwege mit signifikanten Expressionsänderungen in der Entwicklung

Wie in Kapitel 4.1.4.1 beschrieben, konnten bei den Entwicklungsstadien ENTW-25, ENTW-30 und ENTW-100 die Signalwege der Wachstumsfaktoren „*Interleukin 7*“ (*IL7*), „*Erythropoietin*“ (*EPO*) und *VEGF* als stark überrepräsentiert und in der Mehrzahl von herabregulierten Genen geprägt detektiert werden. Allerdings ließ sich in diesen Stadien weder für das Gen *IL7* noch für *EPO* eine Expression im HVC beobachten. Auch der *EPO*-Rezeptor (*EPOR*) war in keiner Entwicklungsgruppe als signifikant verändert nachweisbar, und das Expressionsmuster des *IL7*-Rezeptors (*IL7R*) entsprach während der Entwicklung nicht dem des *IL7*-Signalweges (Tab. 4.28). So war die Expression von *IL7R* in den Stadien ENTW-30 und ENTW-100 nicht mehr gegenüber den Kontrolltieren herabreguliert.

Analog zum *VEGF*-Signalweg (Tab. 4.2) waren *VEGFC* und „*Placental growth factor*“ (*PGF*) in allen Entwicklungsgruppen gegenüber den adulten Kontrolltieren herabreguliert (Tab. 4.28). *VEGFA* hingegen wurde unabhängig von der Östradiolgabe stets in der jüngsten Gruppe signifikant heraufreguliert und glich in allen älteren Gruppen der Expression der Kontrollgruppe. Unabhängig von der Behandlungsdauer hob Östradiol im HVC aller Altersstadien *VEGFC* auf das Expressionsniveau der adulten Kontrollgruppe (Tab. 4.28). Eine Stimulation ihrer Expression erfuhren auch die *VEGF*-Rezeptoren „*Kinase insert domain receptor*“ (*KDR*) (a type III receptor tyrosine kinase, *VEGFR1/VEGFR2*) und „*Fms-related tyrosine kinase 4*“, (*FLT4*, *VEGFR3*) nach siebentägiger Östradiolbehandlung bei 50 und 100, sowie „*vascular endothelial growth factor receptor 1*“ (*FLT1*) bei 100 Tage alten Zebrafinken. Folglich schienen die detektierten Varianten des *VEGF*-Gens, das ein zentrales Regulationsglied der Angiogenese im HVC adulter

Kanarienvögeln bildet (Louissaint et al., 2002), unterschiedlich auf die Hormongabe zu reagieren, was möglicherweise auf unterschiedliche Funktionen der Varianten schließen ließe.

Tab. 4.28. Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die im Laufe der Entwicklung Veränderungen zeigen und teilweise durch Östradiol modifiziert werden relativ zu den adulten Tieren. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.

		Entwicklung					Ein Tag Ö ₂			Sieben Tage Ö ₂			<div>3</div> <div>2,5</div> <div>2</div> <div>1,5</div> <div>1</div> <div>0,67</div> <div>0,5</div> <div>0,4</div> <div>0,33</div>
		19	25	30	50	100	19	50	100	25	50	100	
Rezeptor-Familie	IL												
Rezeptor	IL7R												
Liganden	IL7												
	IL8												
Rezeptor-Familie	VEGF												
Rezeptoren	KDR												
	FLT1												
	FLT4												
Liganden	VEGFA												
	VEGFC												
Rezeptor-Familie	PDGF												
Rezeptoren	PDGFRA												
	PDGFRB												
Liganden	PDGFA												
	PDGFC												
	PDGFD												
Rezeptor-Familie	EGF												
Ligand	EGF												

Weitere Signalwege, die eine Rolle bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems spielen, werden von den Wachstumsfaktoren der *PDGF*- und *EGF*- Familie aktiviert. Wie bereits für *VEGF* beschrieben, erfuhren ihre Signalwege in den Entwicklungsstadien eine signifikante Veränderung, jedoch waren im Falle der *PDGF*- und *EGF*- Signalwege anteilmäßig weniger Gene gegenüber der Kontrolle inhibiert (Tab. 4.2). Stärker als im HVC der adulten Kontrolltiere waren im Speziellen der Wachstumsfaktor „*Platelet-derived growth factor alpha polypeptide*“ (*PDGFA*) bei der Gruppe ENTW-19, „*Platelet-derived growth factor rezeptor A*“ (*PDGFRA*) bei den Entwicklungsstadien ENTW-19 bis ENTW-50 und „*Epidermal growth factor*“ (*EGF*) in den Entwicklungsstadien ENTW-19 bis ENTW-30 exprimiert (Tab. 4.28). Anders als bei *VEGFC* erwies

sich die Wirkung von Östradiol auf die Expression von *PDGF* und *EGF* im HVC als vom Alter und der Behandlungsdauer abhängig.

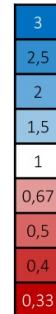
Für die hier im HVC detektierten angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren ließ sich somit festhalten, dass während der normalen Wachstumsphase des HVC im Alter von 19 *VEGFA* und von 19 bis 50 Tagen *KDR (VEGFR2)*, *PDGFRA* und *EGF* ein erhöhtes Expressionsniveau zeigten. Generell durch Östradiol aktiviert wurde dagegen die *VEGFC*-, *FLT1*- und *FLT4*-Expression (Tab. 4.28).

4.2.7.2. Effekte auf Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren bei neuronalen Prozessen mit signifikanten Expressionsänderungen in der Entwicklung

Insbesondere für den HVC 25 Tage alter Zebrafinkenmännchen konnte in Kapitel 1 gezeigt werden, dass Neurogenese und Axonogenese mit relativ hoher Signifikanz detektierbar waren. Beide Prozesse schienen zu Beginn des Gesangslernens gehemmt, da die Mehrzahl der mit diesen Vorgängen assoziierten Gene gegenüber den adulten Kontrolltieren herunterreguliert war (Tab. 4.6 und 4.7), einschließlich Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (siehe Anhang). Da alle dabei mit dem Prozess der Axonogenese assoziierten Wachstumsfaktoren und -rezeptoren auch im Rahmen des Prozesses der Neurogenese betroffen waren, ließ sich hinsichtlich der Rolle dieser Gene nicht zwischen den beiden Prozessen unterscheiden. Durch eine siebentägige Östradiolbehandlung wurden beide Prozesse insbesondere bei den Gruppen 7Tage-Ö₂-50 und 7Tage-Ö₂-100 stimuliert (Tab. 4.19 und 4.20). In Übereinstimmung damit ließ sich bezüglich der Expression von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, die mit Neurogenese und Axonogenese assoziiert waren, feststellen, dass einige nach sieben Tagen in eben diesen Gruppen durch Östradiol heraufreguliert wurden: „*Bone morphogenetic protein 4*“ (*BMP4*), „*Fibroblast growth factor receptor*“ (*FGFR*) 2 und 4, „*Growth arrest-specific*“ 6 und 8 (*GAS*), „*Low density lipoprotein receptor-related protein 5*“ (*LRP5*), „*Receptor-like tyrosine kinase*“ (*RYK*), „*Wingless-type MMTV integration site family, member*“ 5A, 6, 7A, 8A und 8B (*WNT*) (Tab. 4.29), sowie *VEGFC* (Tab. 4.28). Auffällig bei dieser Liste war, dass mit verschiedenen *WNT*-Genen und *LRP5* sowohl Liganden als auch eine Komponente des *WNT*-Rezeptorkomplexes betroffen waren. Antworten auf die Fragen welche Rolle die oben genannten Wachstumsfaktoren und Rezeptoren im HVC spielen und ob die Anregung ihrer Expression für die Stimulation von Neurogenese und Axonogenese im HVC notwendig sind, müssen weiterführende Experimente liefern.

Tab. 4.29. Expression von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren neuronaler Prozesse, die im Zuge der Entwicklung starke Veränderungen ihrer Überrepräsentation aufweisen relativ zu den adulten Tieren. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen siehe Text. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.

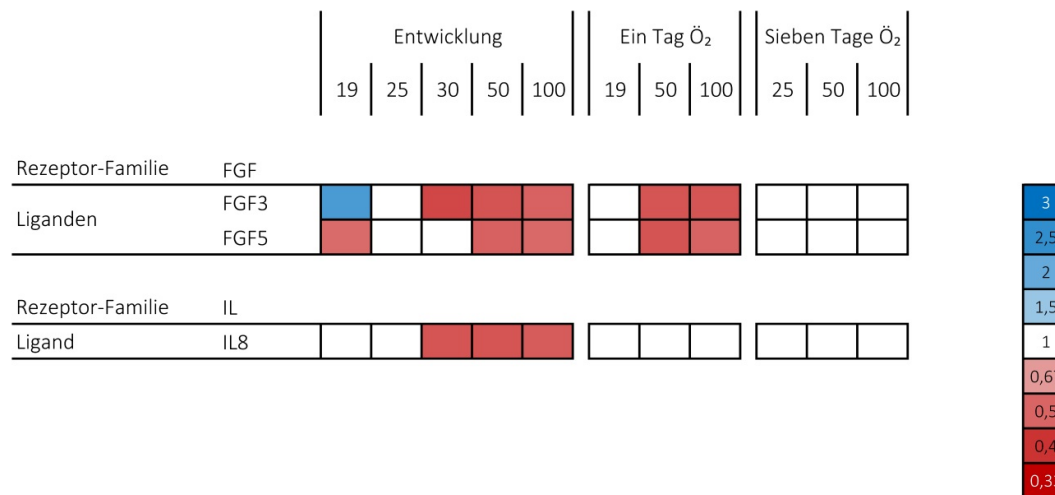
		Entwicklung					Ein Tag Ö ₂			Sieben Tage Ö ₂		
		19	25	30	50	100	19	50	100	25	50	100
Rezeptor-Familie	FGF											
Rezeptoren	FGFR2											
	FGFR4											
Rezeptor-Familie	TGFB											
Ligand	BMP4											
Rezeptor-Familie	RTK											
Liganden	GAS6											
	GAS8											
Rezeptor-Familie	WNT											
Rezeptoren	LRP5											
	RYK											
Liganden	WNT5A											
	WNT6											
	WNT7A											
	WNT7B											
	WNT8A											
	WNT8B											



4.2.7.3. Angleichung der Expression von Wachstumsfaktoren durch Östradiol an das Niveau adulter Tiere

Das Expressionsmuster dreier Wachstumsfaktoren beschrieb über die Entwicklungsgruppen hinweg einen eindeutigen Trend. So verringerte sich die Expression der Wachstumsfaktoren *FGF3*, *FGF5* und *IL8* im HVC während der Gesangslernphase (Tab. 4.30). Durch eine siebentägige Östradiolbehandlung stieg ihr Expressionslevel im HVC 50 und 100 Tage alter Vögel auf dasjenige jüngerer Entwicklungsstadien an.

Tab. 4.30. Expression von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, die im Zuge der Behandlung mit Östradiol eine Angleichung der Expression an das Niveau der adulten Tiere erfahren relativ zu den adulten Tieren. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.



4.2.7.4. Altersunabhängige Stimulation der Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren durch eine siebentägige Östradiolbehandlung

Bei den Wachstumsfaktorrezeptoren „*Bone morphogenic protein receptor type II*“ (*BMPRII*), „*Epidermal growth factor receptor*“ (*EGFR*), „*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4*“ (*ERBB4*) und „*Fibroblast growth factor receptor1 & 3*“ (*FGFR1* und *3*) bewirkte die Siebentagebehandlung stets eine Erhöhung des Expressionsniveaus (Tab. 4.31). Eine Festlegung auf Veränderungen bestimmter biologischer Prozesse, die mit den Expressionsänderungen dieser Rezeptoren einher gingen war nicht möglich, da sie an sehr vielen beteiligt sind. So war z. B. die Rolle des *EGF*-Rezeptors *ERBB4* sehr wahrscheinlich nicht auf die Entwicklung des Blutgefäßsystems reduziert. Neben dem Rezeptor waren auch die beiden Liganden „*Neuregulin2 & 3*“ (*NRG2 & 3*) (Carraway et al., 1997) nach siebentägiger Hormongabe deutlich verstärkt exprimiert (Tab. 4.31). Die durch Neureguline vermittelte Aktivierung des *ERBB4*-Rezeptors ist entwicklungs- und zellabhängig bei Nagetieren für die Myelinisierung, die Neurotransmission und die synaptische Plastizität von Bedeutung (Mei & Nave, 2014).

Tab. 4.31. Expression von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, die altersabhängig durch die Behandlung mit Östradiol eine Veränderung in der Expression aufweisen relativ zu den adulten Tieren. Der faktorielle Expressionsunterschied ist farblich codiert. Zur Erläuterung der Abkürzungen der Gennamen siehe Text.

		Entwicklung					Ein Tag \ddot{O}_2			Sieben Tage \ddot{O}_2			
		19	25	30	50	100	19	50	100	25	50	100	
Rezeptor-Familie	EGF												
Rezeptoren	EGFR												3
	ERBB4												2,5
Liganden	EGF												2
	NRG2												1,5
	NRG3												1
Rezeptor-Familie	FGF												0,67
Rezeptoren	FGFR1												0,5
	FGFR3												0,4
													0,33
Rezeptor-Familie	TGFB												
Rezeptor	BMPR2												

4.2.8. Hemmung früher östrogener Effekte durch die Behandlung mit Fadrozol

Neben der Gabe von Hormonen bietet die Verwendung von Substanzen, welche die Östradiolsynthese durch das Enzym Aromatase hemmen, eine alternative Strategie zur Untersuchung der Rolle von Östradiol für die Entwicklung des Gesangssystems. Durch den Einsatz des Aromataseinhibitors Fadrozol, der auch bei Singvögeln die Östrogensynthese aus Testosteron verhindert (Wade et al., 1994), kommt es im HVC von Zebrafinkenmännchen zur Verringerung der Expression der Gene für *BDNF* (Dittrich et al., 1999) und den Androgenrezeptor (Kim et al., 2004). Auf anatomischer Ebene wirkt sich die Behandlung juveniler Vögel mit Fadrozol allerdings erst im adulten HVC aus (Wade & Arnold, 1994; Absil et al., 1994; Merten & Stocker-Buschina, 1995). Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Östradiol auf die Genexpression des HVC zwischen 19 und 30 Tagen nach dem Schlupf, in einer Phase, in der große Veränderungen des Expressionsmusters beobachtet werden konnten (Abb. 4.2), wurden juvenile Zebrafinkenmännchen im Alter von achtzehn Tagen für die Dauer von zwölf Tagen mit einem Fadrozol- oder Östradiolpellet implantiert.

In einem ersten Schritt wurde das Transkriptom der mit Fadrozol (12Tage-FAD-30) und Östradiol (12Tage-Ö₂-30) behandelten Tiere mit dem der bereits in der Entwicklungsstudie analysierten Gruppen (ENTW-19, ENTW-25, ENTW-30, ENTW-50 und ENTW-100) verglichen. Zur

Bestimmung der Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster der einzelnen Gruppen wurde - analog zu Abbildung 4.9 - der Euklid'sche Abstand zwischen den sieben Gruppen bestimmt und ein Dendrogramm erstellt (Abb. 4.10). Diese Analyse ergab, dass die für zwölf Tage mit Östradiol behandelten Vögel eine stärkere Ähnlichkeit gegenüber den 19 Tage alten Zebrafinken als gegenüber allen übrigen Gruppen aufwiesen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die frühe Östradiolgabe die Reifung des Gesangssystems inhibiert. Wurde dagegen die endogene Östrogensynthese durch die Gabe von Fadrozol gehemmt, war die resultierende Gruppe 12Tage-FAD-30 verschieden von den Gruppen ENTW-25 und ENTW-30, sowie den älteren Entwicklungsgruppen ähnlicher als der jüngeren. Dies spricht für eine zunehmende Reifung der Genexpression im HVC als Folge reduzierter Östrogensynthese und somit einer eher inhibitorischen Rolle östrogenabhängiger Prozesse.

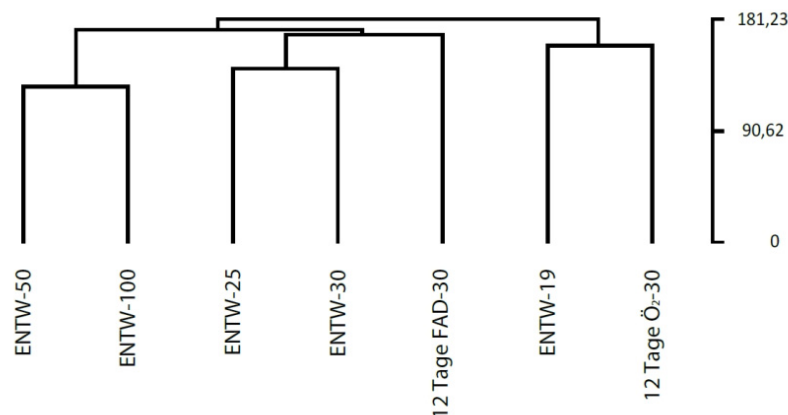


Abb. 4.10. Vergleich des HVC-Transkriptoms der Entwicklungsgruppen (ENTW-) mit dem 30 Tage alten Vögel nach zwölf tägiger Behandlung mit Östradiol (12Tage-Ö₂-30) bzw. Blockade der Östrogensynthese durch die Gabe von Fadrozol (12Tage-FAD-30) relativ zu den adulten Tieren. Dargestellt ist das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse aller detektierten Gene in Form eines Dendrogramms (Euklid'sche Abstandsberechnung, Methode: Bestimmung des kleinsten mittleren Abstands (*average linkage*)). Sie zeigte, dass erstens Östradiol die Reifung des Genexpressionsmusters im HVC verhinderte, und dass zweitens der Östrogensynthesehemmer in der frühen Entwicklung eine Angleichung des Transkriptoms an das älterer Kontrolltiere verursachte bzw. nicht verhinderte.

4.2.8.1. Gegenläufige Effekte von Östradiol und Fadrozol auf biologische Prozesse

Zur Eingrenzung aller Veränderungen der Genexpression im HVC, die nach der Östradiolbehandlung zu beobachten waren, auf solche, die auch von endogenem Östrogen verursacht werden, wurden im Weiteren sämtliche Gene ermittelt, die nach der Behandlung mit Östradiol und Fadrozol ein gegenläufiges Expressionsmuster aufwiesen. Hierbei wurden nur jene

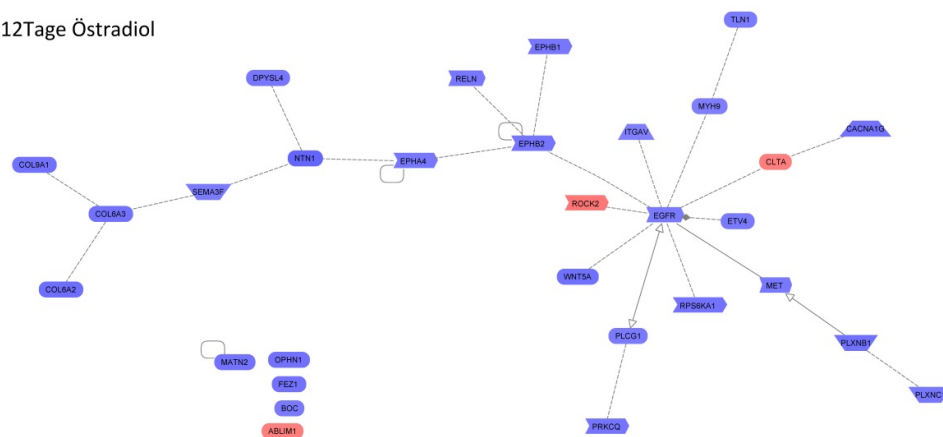
Gene verwendet, die sich nach beiden Behandlungsregimen signifikant von der Kontrollgruppe (ENTW-30) unterschieden. Insgesamt zeigten 702 Gene ein gegenläufiges Expressionsprofil, wovon 627 nach Östradiolgabe herauf- und 75 Gene herabreguliert waren. Fadrozol induzierte folglich die Inhibition von 627 und die Aktivierung von 75 Genen. Dies verdeutlichte einen sehr stark aktivierenden Effekt durch die östrogene Behandlung bzw. einen sehr stark inhibierenden Effekt durch die Fadrozolgabe.

Tab. 4.32. Biologische Prozesse der im HVC nach zwölfwägiger Östradiol- und Fadrozolbehandlung gegenläufig regulierten Gene relativ zu den adulten Tieren. Gezeigt werden alle signifikanten Prozesse mit $p \leq 1 \cdot 10^{-5}$ und die Summe aller überrepräsentierten Prozesse mit $p \leq 1 \cdot 10^{-2}$. Das Signifikanzniveau (\log_{10}) ist farblich codiert. Angegeben ist zudem das Verhältnis der Anzahl der nach Östradiolgabe herauf- bzw. herabregulierten Gene.

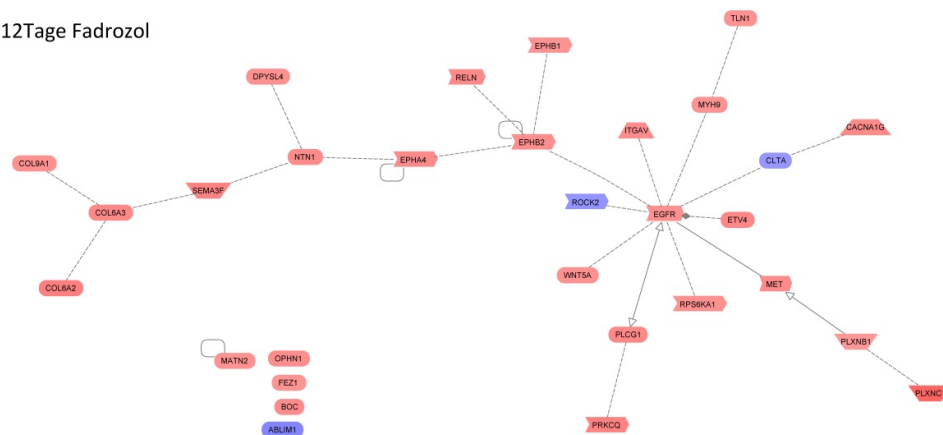


Zur funktionellen Analyse der detektierten Gene wurden diese biologischen Prozessen zugeordnet. Insgesamt konnten 242 überrepräsentierte Prozesse detektiert werden ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$), wovon lediglich neun das *a priori* festgelegte Signifikanzniveau von $1 \cdot 10^{-5}$ unterschritten (Tab. 4.32). Stark überrepräsentiert waren Gene, die im Zusammenhang der Energiegewinnung durch transmembranen Ionentransport, Mitose und der Organisation der extrazellulären Matrix stehen.

12Tage Östradiol



12Tage Fadrozol



Aktivierung
 Inhibition
 Modulation

Interaktion experimentell validiert
 Interaktion "expert-curated"



Abb. 4.11. Gennetzwerk des biologischen Prozesses „Axon guidance“, welcher infolge der Veränderung des Hormonregimes gegenüber der gleichaltrigen Kontrolle signifikant ($p=1,51 \cdot 10^{-4}$) verändert war. Östradiol (oberes Netzwerk) induzierte eine Heraufregulation, Fadrozol (unteres Netzwerk) eine Herabregulation der Genexpression. Im Zentrum des detektierten Clusters stand mit EGFR („Epidermal growth factor receptor“) ein Wachstumsfaktor, welcher durch „crosstalk“ mit dem Östrogenrezeptor α aktiviert werden kann.

Die Entwicklungsstudie hatte ergeben, dass zu Beginn der Gesangslernphase neben der Neurogenese insbesondere die Bildung axonaler Verbindungen im HVC detektierbar war (Tab. 4.6 und 4.7). Unter Berücksichtigung eines Signifikanzniveaus von $p \leq 1 \cdot 10^{-5}$ konnte „*Axon guidance*“ als erster spezifisch neuronaler biologischer Prozess nachgewiesen werden ($p = 1,51 \cdot 10^{-4}$), der durch Östradiol und Fadrozol gegenläufig reguliert wurde. Im Zentrum des dabei detektierten Netzwerkes (Abb. 4.11) stand mit *EGFR* der Rezeptor eines Wachstumsfaktors, der direkt mit Östrogenrezeptoren, wie *ER-α* interagieren kann (Migliaccio et al., 2006). Dieses Ergebnis komplementierte die Beobachtung, dass die Expression von EGF im HVC derselben Entwicklungsphase wenig sensitiv gegenüber Östradiol war (Tab. 4.30). Somit schien Östradiol den EGF-Signalweg eher über die Stimulation der Expression des Rezeptors als die des Liganden zu regulieren.

4.3. Testosteron-Behandlung

Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Wirkung von Testosteron auf die Entwicklung des in dieser Arbeit nicht untersuchten Gesangs bei Zebrafinkenmännchen sind im Gegensatz zu denen mit Östrogen recht unzweifelhaft. Sowohl der Gesangsbeginn (Sossinka et al., 1975) als auch die Entwicklung eines stereotypen Gesangs werden von Androgenen beeinflusst (Bottjer & Hewer, 1992), wobei ein zu hoher, adulter Testosteronlevel im Blutplasma juveniler Vögel das Kopieren des Tutorgesangs behindert (Korsia & Bottjer, 1991). Über die Vorgänge auf molekulargenetischer Ebene ist bislang nur sehr wenig bekannt. So hat die systemische Behandlung von Männchen in der ersten Woche nach dem Schlupf mit dem nicht in Östradiol umwandelbaren (=aromatisierbarem) Androgen DHT (5 α -Dihydrotestosterone) oder dem Androgenrezeptorantagonisten Flutamid keinen Einfluss auf das Volumen des HVC (Schlinger & Arnold, 1991; Grisham et al., 2007).

4.3.1. Anzahl regulierter Gene

Die siebentägige Östradiolbehandlung führte bei Männchen in der Gesangslernphase zu Veränderungen der neuronaler Entwicklungsprozesse im HVC (Tab. 4.20). Um durch Testosteron bzw. Östradiol induzierte Effekte auf die Genexpression im HVC vergleichen zu können, wurden sechs männliche Zebrafinken im Alter von 43 Tagen mit Testosteron („7Tage-T-50“) implantiert. Parallel dazu wurden sechs männliche Zebrafinken mit Dihydrotestosteron („7Tage-DHT-50“) behandelt, einem nicht wie Testosteron in Östrogen umwandelbares Androgen (Saldanha & Schlinger, 2008), um speziell androgene Effekte identifizieren zu können. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet, deren HVC entnommen und das Transkriptom analysiert. Beide Androgenderivate sind in der Lage Androgenrezeptoren zu binden, wobei Dihydrotestosteron in Ratten ein 100 bis 200 -fach höhere Affinität für den Androgenrezeptor aufweist (Kolvenbag et al., 1998).

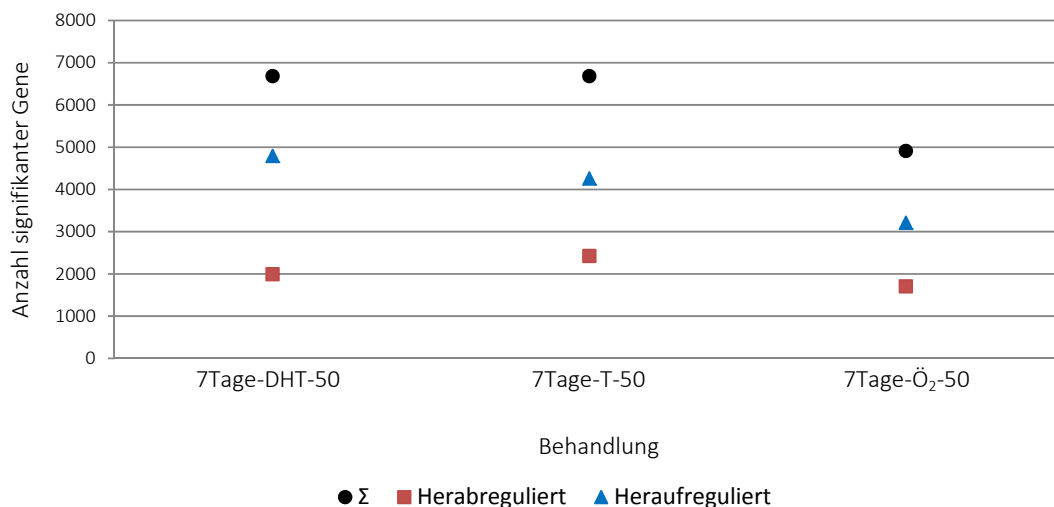


Abb. 4.12. Dargestellt ist die Anzahl aller relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich regulierten Gene (schwarz) nach siebentägiger Behandlung mit Dihydrotestosteron (7Tage-DHT-50) und Testosteron (7Tage-T-50), getrennt nach herab- (rot) und heraufregulierten (blau) Genen. Zum Vergleich sind die Daten der siebentägigen Östradiolbehandlung bei gleichaltrigen Zebrafinken (7Tage-Ö₂-50) dargestellt.

Die siebentägige Behandlung mit den männlichen Sexualhormonen Dihydrotestosteron und Testosteron veränderte insgesamt 7541 Gene in ihrer Expression (Expressionsstärke $\geq 0,5$ (\log_{10}); FDR = 0,0). Sowohl nach Dihydrotestosteron-, wie auch nach Testosteronbehandlung waren in beiden Gruppen jeweils 6681 Gene signifikant reguliert, wobei die Mehrzahl in beiden Gruppen heraufreguliert wurde (Abb. 4.12). Die Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der heraufregulierten Gene nach einer Testosteronbehandlung (Tab. 4.33) könnte auf der gleichzeitigen Wirkung von Androgenen und Östradiol beruht haben, welches durch Aromatase aus Testosteron gebildet werden kann.

Tab. 4.33. Angabe der Expressionsmaxima und –minima, sowie der Quotienten der Anzahl herauf- zu herabregulierter Gene im HVC männlicher Zebrafinken nach siebentägiger Testosteron- und Dihydrotestosteronbehandlung.

	7Tage-DHT-50	7Tage-T-50
heraufreguliert	8,22	5,50
herabreguliert	0,24	0,37
Verhältnis	2,4:1	1,8:1

4.3.2. Schnittmengen

Wie bereits die übereinstimmenden Mengen aller regulierten Gene vermuten ließ, resultierte aus der Schnittmengenanalyse beider mit Androgenen behandelten Gruppen eine hohe Ähnlichkeit (Abb. 4.12). Die Mehrzahl der herab- (64,1%), wie auch der heraufregulierten Gene (78,5%) war in der Schnittmenge beider Gruppen enthalten. Dies unterstrich die Ähnlichkeit der Wirkung der beiden Androgene auf die Genexpression im HVC.

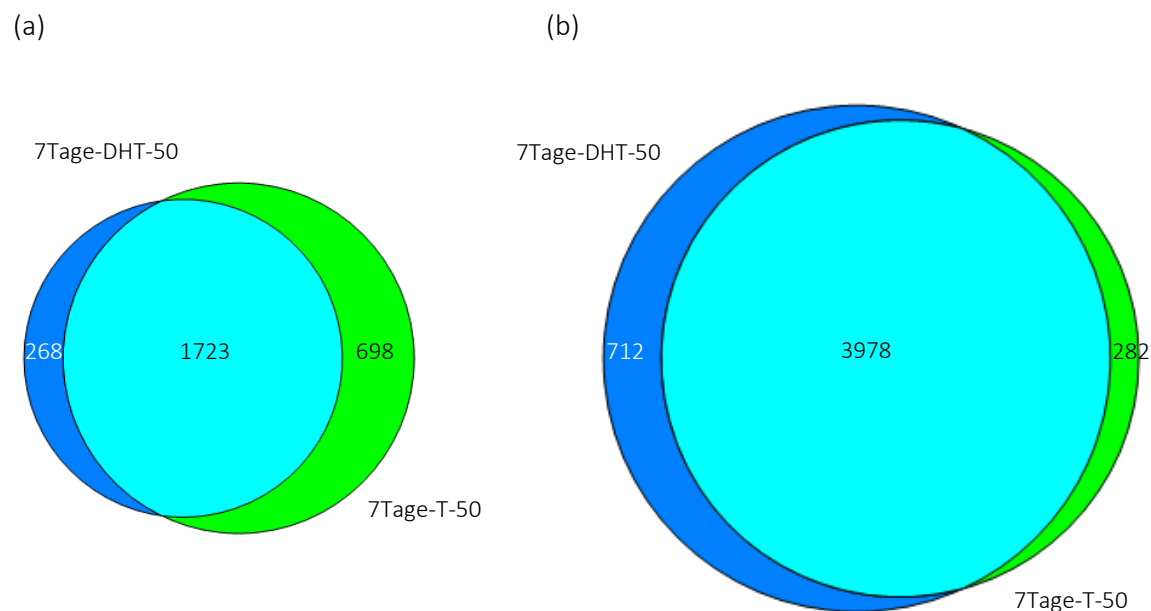


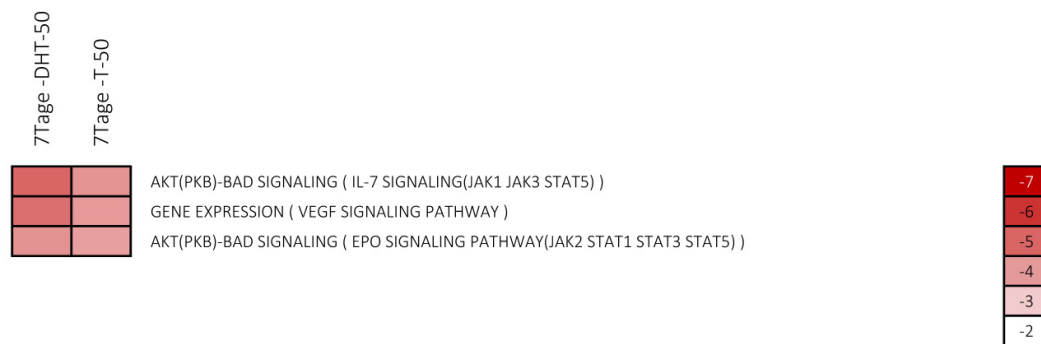
Abb. 4.13. Anzahl der relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen regulierten Gene nach siebentägiger Behandlung mit Dihydrotestosteron (7Tage-DHT-50) und Testosteron (7Tage-T-50), aufgeschlüsselt nach Expressionsrichtung: (a) herabregulierte, (b) heraufregulierte Gene. Die Größe der Kreise der Venn-Diagramme korreliert mit der Anzahl der jeweiligen Gene. Die Überlappungen der Kreise repräsentieren die Anzahl der Gene, die nach beiden Behandlungen mit Androgenen reguliert waren. Farblich codiert die jeweilige Behandlung (blau = Dihydrotestosteron, grün = Testosteron).

4.3.3. Kanonische Signalwege

Infolge siebentägiger Behandlung waren bei beiden Behandlungen die bereits beschriebenen Signalwege „*VEGF signaling pathway*“ und „*AKT(PKD)-BAD signaling*“ (vergleiche Tab. 4.18 (Kapitel 4.2.2.3) signifikant überrepräsentiert, wenn auch unter Berücksichtigung unterschiedlicher Signifikanzschranken: Dihydrotestosteron ($p \leq 1 \cdot 10^{-5}$), Testosteron ($p \leq 1 \cdot 10^{-4}$). Beide Cluster setzten sich aus mehrheitlich heraufregulierten Genen zusammen. Im Zentrum

beider Cluster befand sich das Enzym „*Mitogen activated kinase 1*“ (MAPK1), welches eine zentrale Rolle im ubiquitär ausgeprägten MAP-Kinase Signalweg spielt.

Tab. 4.34. Kanonische Signalwege, die im Rahmen einer „canonical pathway analysis“ (Genomatix) der relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen unterschiedlich exprimierten Gene im HVC nach siebentägiger Androgengabe als signifikant überrepräsentiert detektiert wurden ($p < 1 \cdot 10^{-4}$). Das Signifikanzniveau (\log_{10}), mit dem der jeweilige Signalweg überrepräsentiert war, ist farblich codiert dargestellt. Für jede Versuchsgruppe ist das Verhältnis der Anzahl herauf- zur Anzahl herabregulierter Gene eines Signalwegs angegeben.



4.3.4. Biologische Prozesse

Wie aufgrund der großen Schnittmengen zu erwarten war, zeichneten sich die mit Testosteron und Dihydrotestosteron behandelten Gruppen durch die Überrepräsentation derselben biologischen Prozesse aus, für die ähnliche Signifikanzniveaus berechnet wurden. In beiden Gruppen konnten 832 signifikant regulierte biologische Prozesse detektiert werden ($p < 1 \cdot 10^{-2}$).

Hervorzuheben ist, dass die testosteronbehandelte Gruppe, bei der alleine additive östrogene Effekte zu erwarten waren, lediglich einen signifikanten biologischen Prozess aufwies, der in der DHT-Gruppe nicht zu finden war. Hierbei handelte es sich um „*Positive regulation of neurogenesis*“ ($p = 6,06 \cdot 10^{-7}$). Alle übrigen Prozesse waren entweder bei beiden Gruppen signifikant verändert oder in keiner Gruppe zu finden. Im Zentrum des Prozesses „*Positive regulation of neurogenesis*“ stehen mit „*Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa*“ (CTNNB1) eine nachgeschaltete Schlüsselkomponente des kanonischen WNT-Signalweges, und mit VEGFA ein Wachstumsfaktor der VEGF-Familie, welcher bereits im Zusammenhang mit Neurogenese im HVC adulter Kanarienvögel untersucht worden ist (Louissaint et al., 2002; Hartog et al., 2009).

Tab. 4.35. Analyse der relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen am stärksten signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse nach siebentägiger Behandlung mit Dihydrotestosteron (DHT) und Testosteron (T). Namentlich genannt sind die am stärksten überrepräsentierten Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-10}$) und angeführt ist die Gesamtanzahl aller überrepräsentierten Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Das Signifikanzniveau ist farblich codiert (\log_{10}).

7 Tage -DHT-50	7 Tage -T-50		
1,1:1	1,3:1	MACROMOLECULE MODIFICATION	-22
1,0:1	1,3:1	CELLULAR PROTEIN MODIFICATION PROCESS	-19
1,0:1	1,2:1	CELLULAR PROTEIN METABOLIC PROCESS	-16
1,8:1	2,1:1	DEVELOPMENTAL PROCESS	-13
1,3:1	1,5:1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-10
1,3:1	1,5:1	CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION AT CELLULAR LEVEL	-7
1,2:1	1,2:1	PHOSPHATE-CONTAINING COMPOUND METABOLIC PROCESS	
1,1:1	1,3:1	PROTEIN METABOLIC PROCESS	
1,9:1	2,1:1	SYSTEM DEVELOPMENT	
1,2:1	1,4:1	LOCALIZATION	
1,3:1	1,7:1	PEPTIDYL-AMINO ACID MODIFICATION	
1,2:1	1,3:1	CELL CYCLE	
656	647	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$)	

4.4. Vergleich androgener und östradioler Effekte

Im Vogelgehirn können Androgene und Östrogene aus Vorläufermolekülen direkt synthetisiert werden, sowie aus gonadalem Testosteron durch die Aktivität von 5α -Reduktase bzw. Aromatase entstehen (für Übersichtsartikel siehe: Schlinger, 1997; Schlinger & Remage-Healey, 2012). Beobachtungen bei verschiedenen Singvogelarten lassen die Annahme zu, dass Östrogene die Plastizität des Gesangs fördern, während Androgene ihr entgegen wirken (Schlinger, 1997). Auch bei juvenilen Zebrafinkenmännchen scheinen Androgene für die Entwicklung eines stereotypen Gesangs notwendig zu sein (Bottjer & Hewer, 1992). Allerdings ist die Funktion von Östrogen für das Gesangslernen der Zebrafinken noch unklar (Wade & Arnold, 2004).

Auf welche Weise Androgene und Östrogene eine antagonistische Wirkung entfalten könnten, ist nicht bekannt. Bei Zebrafinken sind überhaupt nur wenige östrogene Effekte auf das Gesangssystem beschrieben. So führt die Behandlung juveniler Männchen mit Östrogen zur verstärkten Expression von *BDNF* (Dittrich et al., 1999) und Abnahme des Serotoninlevels (Wade et al., 2013) im HVC. Nach Hemmung der Aromatase erfolgt im HVC eine verringerte Expression von *BDNF* (Dittrich et al., 1999) und des Androgenrezeptors (Kim et al., 2004).

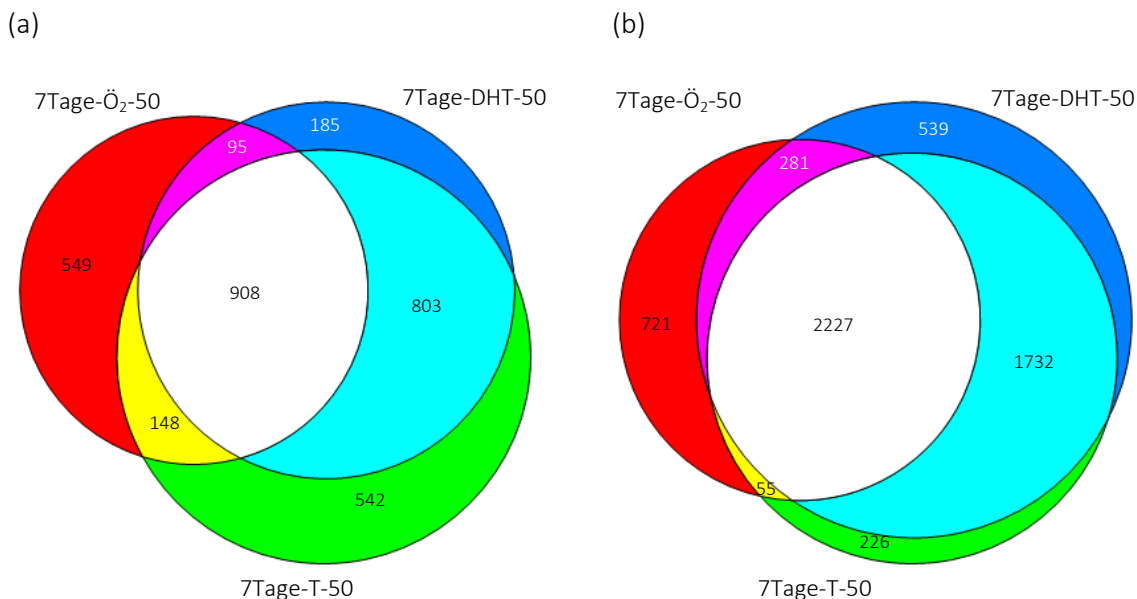


Abb. 4.14. Anzahl der relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen regulierten Gene nach siebentägiger Behandlung mit 17β -Östradiol (7Tage-Ö₂-50), Dihydrotestosteron und Testosteron, aufgeschlüsselt nach Expressionsrichtung: (a) herabregulierte, (b) heraufregulierte Gene. Die Größe der Kreise der Venn-Diagramme korreliert mit der Anzahl der jeweiligen Gene. Die Überlappungen der Kreise repräsentieren die Anzahl der regulierten Gene. Farblich codiert ist die jeweilige Behandlung (rot = 17β -Östradiol, blau = Dihydrotestosteron, grün = Testosteron).

Aus der Analyse der Schnittmengen der drei mit Testosteron, Östradiol und dem nicht aromatisierbaren Dihydrotestosteron behandelten Gruppen sollte hervorgehen, welche Veränderungen der Genexpression im HVC auf einen androgenen bzw. östrogenen Mechanismus zurückgeführt werden können. Die gemeinsame Schnittmenge der drei Gruppen umfasste jeweils ca. ein Drittel der Gene, deren Expression durch eine Regulation aller Behandlungen in der gleichen Weise verändert wurde (Abb. 4.14). Getrennt nach Expressionsrichtung fiel die Schnittmenge der herabregulierten Gene (28,1%) etwas geringer aus, als die der heraufregulierten (38,5%). Der am wahrscheinlichsten durch die in der Schnittmenge aller drei Gruppen repräsentierten, zumeist heraufregulierten Gene (das Verhältnis herauf- zu herabregulierte Gene 9,5:1) veränderte biologische Prozess war „*Agrin in postsynaptic differentiation*“ ($p=1,0 \cdot 10^{-5}$).

Erwartungsgemäß lagen die Schnittmengen der beiden mit Androgenen behandelten Gruppen (7Tage-DHT-50 vs. 7Tage-T-50: herabreguliert = 53%; heraufreguliert = 68,5%) über denen des Östradiols mit den Androgenen (herabreguliert: 7Tage-DHT-50 vs. 7Tage-Ö₂-50: 39,2%, 7Tage-T-50 vs. 7Tage-Ö₂-50: 35,7%; heraufreguliert: 7Tage-DHT-50 vs. 7Tage-Ö₂-50: 45,6%, 7Tage-T-50 vs. 7Tage-Ö₂-50: 43,5%). Überraschend gering fiel mit 203 Genen (2,7% aller in den drei Gruppen regulierten Gene) die Schnittmenge von Testosteron und Östradiol aus (Abb. 4.14., gelbe Flächen). Diese Gruppe ist insofern interessant, als dass sie jene Gene widerspiegeln, die aufgrund von Aktivität des Enzyms Aromatase lokal aus Testosteron hergestellt werden könnte. Die weitere Analyse dieser Gene ergab keine signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse. Die weitere Analyse kanonischer Signalwege erbrachte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse.

Die siebentägige Behandlung mit den drei Steroidhormonen Östradiol, Testosteron und Dihydrotestosteron induzierte sehr ähnliche Effekte in der Genexpression, was sich in der hohen Anzahl an Genen äußert, die in allen drei Gruppen reguliert waren. Der Umfang und die Verteilung der Schnittmengen ergaben zudem einige Hinweise auf die hormonellen Effekte. So war davon auszugehen, dass es sich lediglich bei den östradiolspezifischen Genen (rot) und der Schnittmenge aus Testosteron und Östradiol (gelb) um primäre östrogene Effekte handelte, da alle anderen Gene potentiell auch durch das nicht aromatisierbare Dihydrotestosteron reguliert wurden. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass die Promotoren aller anderen Gene Bindungsstellen sowohl für den Androgen- (*androgen response element, ARE-site*), als auch den Östrogenrezeptor (*estrogen response element, ERE-site*) aufwiesen, was deren Expressionsänderung infolge der Hormongabe erklären könnte. Die Schnittmenge aller Gene (weiße Fläche), welche überraschend groß ausfiel, könnte ebenfalls auf indirekte androgene Effekte durch beispielsweise die Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren, wie der *EGF*-, *IGF*-, *PGFB*- oder *VEGF*-Familie zurückzuführen sein (Léotoing et al., 2007; Zhu & Kyprianou, 2008). Daher wurde auch sie nicht für diese Analyse berücksichtigt.

4.4.1. Biologische Prozesse basierend auf Östradiol- und Androgen-spezifischer Genregulation

Zur Detektion biologischer Prozesse, welche auf potentiell antagonistisch wirkenden Effekten von Östrogenen und Androgenen beruhen könnten, wurden die entsprechenden Schnittmengen der Abb. 4.14 analysiert. Bei der Analyse spezifisch durch Östradiol (gelbe und rote Flächen) bzw. Androgene (türkise und blaue Flächen) regulierten Gene wurden insgesamt 442 Prozesse detektiert ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Dem gegenüber waren lediglich 12 Prozesse infolge beider Behandlungsregime nachweisbar, welche nur schwach überrepräsentiert waren, und den Zellzyklus sowie phosphatabhängige metabolische Prozesse betrafen.

Tab. 4.36. Analyse der relativ zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen am stärksten signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse, welche auf östradiol- und testosteronspezifische Genregulation zurückzuführen sind. Namentlich genannt sind die am stärksten überrepräsentierten Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-10}$) und angeführt ist die Gesamtanzahl aller überrepräsentierten Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$). Das Signifikanzniveau ist farblich codiert (\log_{10}).

7Tage-Ö2-Effekt	7Tage-T-Effekt		
		CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION OR BIOGENESIS	-16
		CELLULAR COMPONENT ORGANIZATION	-14
		ORGANELLE ORGANIZATION	-12
			-10
			-8
			-6
263	193	Σ aller regulierten Biologischen Prozesse ($p \leq 1 \cdot 10^{-2}$)	

Bei einem Schwellenwert von $p \leq 1 \cdot 10^{-10}$ repräsentierten nur die nach Östradiolgabe regulierten Gene biologische Prozesse (Tab. 4.31), welche jedoch nicht sehr spezifisch waren. Auch Auswirkungen auf neuronale Prozesse konnten nur für die östrogene Gruppe nachgewiesen werden, wobei „*Neuron differentiation*“ (97 Gene, $p = 2,48 \cdot 10^{-4}$) und „*Neurogenesis*“ (106 Gene, $p = 4,48 \cdot 10^{-4}$) am stärksten vertreten waren.

4.5. Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse der Hormonstudie zur Genexpression im HVC männlicher Zebrafinken im Alter von 19 bis 100 Tagen ließen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Im untersuchten Altersspektrum nahm die Sensitivität der Genexpression im HVC sowohl nach ein- wie auch nach siebentägiger Östradiolbehandlung mit dem Alter zu.
2. Während die eintägige Östradiolbehandlung stets mehr Gene herab- als heraufregulierte, war der Effekt der Siebentagebehandlung in allen Altersstadien mehrheitlich stimulierend.
3. Im Alter von 50 Tagen, also in der sensomotorischen Phase des Gesangslernens, führte die kurzfristige Östradiolbehandlung zur Herabregulation nahezu aller im HVC detektierbaren Gene, die für NMDA-Rezeptoruntereinheiten (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRIN2C*, *GRIN3A*) codieren.
4. Durch Östradiol in ihrer Expression veränderte Gene repräsentierten unabhängig von der Behandlungsdauer auf der Ebene neuronaler Prozesse Vorgänge wie die Entwicklung von Zellfortsätzen, die Orientierung axonalen Wachstums und die Neurogenese.
5. Genexpressionsveränderungen im HVC, die durch eine langfristige Behandlung mit Östradiol bzw. dem Östrogensynthesehemmer Fadrozol zu Beginn der Gesangslernphase hervorgerufen wurden, beeinflussten mit größter Wahrscheinlichkeit den transmembranen Ionentransport, die Mitose und die Organisation der extrazellulären Matrix.
6. Wie ein Vergleich östrogenen und androgenen Effekte zeigte, war Neurogenese im HVC 50 Tage alter Zebrafinkenmännchen allein durch die Aktivität von Östradiol zu erklären. Eine verstärkte Rekrutierung neu geborener Neurone im HVC könnte durch die Heraufregulation der Expression des angiogenetischen Wachstumsfaktors *VEGFC* und seines Rezeptors *KDR* begünstigt worden sein, wie sie im HVC aller Altersstadien nach siebentägiger Behandlung mit Östradiol zu beobachten war.
7. Zu Beginn des Gesangslernens, als die stärksten Veränderungen im Genexpressionsmuster des HVC auftraten, führte die Gabe von Östradiol zur Verjüngung des Expressionsmusters. Die Blockade östrogenen Effekte durch die Behandlung mit Fadrozol hatte keine vergleichbaren Folgen auf die Genexpression.
Dagegen veränderte die siebentägige Östradiolbehandlung bei älteren Stadien das Neuritenwachstum und die Neurogenese gegenüber adulten Kontrolltieren in einem Maße, wie sie bei jüngeren Vögeln während der Entwicklung zu beobachten waren.

5. Diskussion

Das Gesangssystem des Zebrafinken ist ein gut etabliertes Modell zum Studium der sexualdimorphen Entwicklung eines neuronalen Netzwerkes im juvenilen Tier, die bei Männchen mit dem Erlernen eines Werbegesanges einher geht (Arnold, 1997; Juli Wade & Arnold, 2004; Gahr, 2007). Das Gesangslernen des Zebrafinken umfasst zwei kritische Phasen, die sich zeitlich überlappen. In der ersten, sensorischen, wird ein Gesangsmuster memoriert, und in der zweiten, sensomotorischen, beginnend mit erstem eigenem Gesang, wird jener an das erlernte Muster angepasst (Thorpe, 1958; Arnold, 1975). Als morphologisches Korrelat des Übergangs dieser beiden Phasen erscheint im Alter von 25-30 Tagen die Innervierung des RA durch den HVC, von dem der motorische Strang des Gesangssystems seinen Ausgang nimmt (Mooney & Rao, 1994; Bolhuis & Gahr, 2006). Die weitere postnatale Entwicklung des HVC weist beim männlichen Zebrafinken bis zum Alter von ca. 40-60 Tagen eine kontinuierliche Volumenzunahme (Bottjer et al., 1985; Herrmann & Bischof, 1986; Nixdorf-Bergweiler, 1996) und eine Zunahme der Anzahl, Dichte und Größe von Neuronen auf (Herrmann & Bischof, 1986; Nordeen & Nordeen, 1988; Kirn & DeVoogd, 1989). In diesem Alter gleichen die juvenilen Männchen ihren eigenen Gesang dem ihrer Tutoren an. Die Kenntnisse über molekulargenetische Vorgänge während der Gesangslernphase war lange Zeit auf die Analyse einiger Gene und deren Expression beschränkt, was auf fehlende Informationen zum Genom und Transkriptom zurückzuführen war. Die Veröffentlichung des Zebrafinkengenoms (Warren et al., 2010), welches durch vom Max-Planck-Institut für Ornithologie intern durchgeführte Sequenzierungsprojekte weiter ins Detail analysiert wurde, ermöglichte in einem ersten Schritt die Analyse des entwicklungsabhängigen HVC-Transkriptoms und gewährt uns Einblicke in hormoninduzierte molekulargenetische Mechanismen der HVC-Entwicklung.

5.1. Methodendiskussion

Gewebeentnahme

Ein kritischer Faktor für die Microarray-Analyse des HVC stellt die geringe Größe und somit die Menge an extrahierbarer mRNA dar. So umfasst das Volumen des HVC beim erwachsenen männlichen Zebrafinken lediglich ca. 0,45 mm³ und enthält ca. 52.000 Zellen (Gahr, 1988; Nixdorf-Bergweiler, 1996). Bei den jüngeren Stadien (19-30 Tage nach dem Schlupf) zeichnet er sich entsprechend durch ein kleineres Volumen, aber eine höhere Anzahl an Zellen aus. Es musste daher einerseits möglichst viel HVC-Gewebe entnommen werden, um die für die

Amplifikation der mRNA benötigte Menge zu erhalten. Andererseits war die Menge an entnommenem nicht-HVC-Gewebe, welches die Ergebnisse verfälschen würde, zu minimieren. Um diesen Faktoren gerecht werden zu können, wurden die Gehirne zunächst in einem Cryostaten in 40 µm dicke Schnitte unterteilt. Die Färbung der Schnitte („Nissl-Färbung“, siehe Abb. 3.5) ermöglichte es, den HVC auch in den juvenilen Stadien sichtbar zu machen, da er sich aufgrund der Zellstrukturen vom umgebenden Parenchym abgrenzen lässt (Gahr, 1997). Die angewandte Entnahmemethode zeichnet sich daher gegenüber weiteren Studien, in welchen das Gehirn vor der HVC-entnahme nicht oder in dickere Schnitte unterteilt und der Kern unabhängig von der Architektur der Zellen ausgestanzt wurde (Khurshid et al., 2009), durch eine hohe Spezifität des gewonnenen Gewebes aus. Zusätzlich konnte auf die starke anatomische Variabilität vor allem der juvenilen Stadien geachtet und die Menge an fälschlicherweise entnommenem nicht-HVC-Gewebe minimiert werden. Diese Entnahmetechnik bringt jedoch auch Nachteile mit sich. So muss die Zeit, die zwischen dem Auftauen der Schnitte und der Überführung des Gewebes in ein mRNA konservierendes Medium möglichst kurz gehalten werden, um die zu extrahierende mRNA nicht durch aktivierte ubiquitär vorkommende RNAsen zu gefährden. Darüber hinaus limitiert das geringe Zeitfenster die Anzahl an zu entnehmenden Gehirnarealen und führte unter anderem dazu, dass ich meine Analysen auf den HVC beschränkt habe.

Datenanalyse

Für die Analyse der Transkriptome wurde ein zebrafinkenspezifischer Exon-Array der Firma Affymetrix verwendet. Er enthielt Sonden, welche zebrafinkenspezifische Gene binden können. Grundlage für die verwendeten Sonden bildete zum einen das bereits publizierte Zebrafinkengenom (Warren et al., 2010), sowie am Max-Planck-Institut intern durchgeführte Sequenzierungsprojekte. Da nur sehr spärliche Informationen über die Annotation des Transkriptoms vorlagen, war eine möglichst holistische Analyse der funktionellen Änderungen auf der Basis der Zebrafinkensequenzen nicht durchführbar. Daher wurden die Zebrafinkensequenzen orthologen Sequenzen des Humangenoms zugeordnet. Dies erlaubte die Verwendung der *Gene-Ontology* Terminologie für die Zuordnung der detektierten Gene zu spezifischen biologischen Prozessen und kanonischen Signalwegen. Diese Vorgehensweise setzt voraus, dass sich der Großteil der Gene in den detektierten biologischen Prozessen hinsichtlich ihrer Funktion beim Menschen und beim Zebrafinken nicht unterscheidet, wovon basierend auf Studien zum Vergleich eukaryotischer Transkriptome weitestgehend ausgegangen werden kann (Lelandais & Le Crom, 2007; Wu & Li, 2007; Wang & Rekaya, 2009). Jedoch wäre eine weitere Analyse der detektierten Gene, vor allem jener, die im Zentrum der detektierten Signalwege und Prozesse standen, von großem Interesse.

In allen Schritten der gesamten Analyse wurde sehr stringent vorgegangen. So mussten mindestens zehn Sonden pro Transkript signifikant reguliert sein, und der Schwellenwert für die *false discovery rate* (FDR), welche rein formell dem Fehler erster Art entspricht, wurde auf 0,0% gesetzt. Der Grenzwert für die Expressionsstärke wurde anhand der Streuung innerhalb der Replikate definiert, anstatt einen Wert *a priori* zu definieren.

Hormonbehandlung

Zur Manipulation der Hormontiter wurden Hormondepots unter der Rückenhaut der Zebrafinken platziert. Die verwendeten Implantate zeichneten sich durch ein sehr geringes Volumen aus, ermöglichten einen einfachen Implantationsvorgang und kamen bereits in zahlreichen Studien erfolgreich zur Anwendung (Dittrich et al. 1999, 2013). Die Nutzung von Hormondepots birgt das Problem, dass die Pellets zunächst eine sehr hohe Menge an Hormon freisetzen (Quispe et al., 2015), welche sich im Lauf der Zeit verringert. Wie die Messungen der Bluthormontiter jedoch zeigen (**Tab. 3.3 – 3.4**), lag dieser auch nach sieben Tagen deutlich über dem Level placebobehandelter Tiere. Andere Möglichkeiten zur Applikation, wie die tägliche Injektion einer kleineren Hormonmenge in die Brustmuskulatur oder die Verwendung einer hormonhaltigen Creme, wurden aufgrund der täglich notwendigen Behandlung und der damit verbundenen Störung der Tiere, sowie der unnötigen Verursachung von Schmerzen nicht in Betracht gezogen. Aufgrund des hohen Gewichts wurde auch auf die Verwendung osmotischer Pumpen verzichtet, welche die Zebrafinken stark in ihrem Verhalten beeinträchtigt hätten.

Unbeantwortet bleibt die Frage, in welchem Verhältnis der manipulierte Hormontiter zu physiologisch relevanten Werten im HVC steht. Denn zweifellos führte die Hormonimplantation zur Erhöhung des Bluthormontiters in supraphysiologische Bereiche (**Tab. 3.3 – 3.4**). Welche Konzentrationen im HVC erreicht werden können, ist unbekannt. Dialysestudien im auditorischen Gesangsareal NCM, welcher autark in der Lage ist Steroidhormone bilden zu können, zeigen, dass der Hormonlevel im NCM starken, vom sozialen Umfeld abhängigen Schwankungen unterliegt (Ramage-Healey, et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurde durch die systemische Gabe der gesamte Organismus stets mit einer deutlich erhöhten Hormonkonzentration konfrontiert, was möglicherweise die Homöostase aus dem Gleichgewicht gebracht haben könnte. Studien zum Maushippocampus, welcher ebenfalls über alle notwendigen Enzyme für die *de novo* Steroidsynthese verfügt, belegen, dass der lokale Hormontiter den des Blutes sehr deutlich übersteigt (Hojo et al., 2009). Zöge man ähnliche Schwankungen auch für den HVC in Betracht, würde es sich bei den gemessenen Werten (**Tab. 3.3 – 3.4**) um physiologisch relevante Konzentrationen handeln.

5.1. Transkriptom-Veränderungen und die Entwicklung des HVC

Eine altersabhängige Veränderung der transkriptiven Aktivität im HVC war besonders zwischen den beiden ersten untersuchten Altersstadien festzustellen. Während die Anzahl der gegenüber der Kontrollgruppe (ADULT) herabregulierten Gene von 3842 (ENTW-19) auf ein absolutes Maximum von 4997 (ENTW-25) anstieg, reduzierte sich die der heraufregulierten von 2233 (ENTW-19) auf 945 (ENTW-25). Bemerkenswerterweise äußerte sich dieser Entwicklungssprung in der Genexpression nicht durch die Aktivierung altersgruppenspezifischer biologischer Prozesse, sondern umfasste vielmehr das gesamte Transkriptom und beruhte somit nicht auf der Aktivierung eines bestimmten biologischen Prozesses. Vielmehr kam es zu einer

globalen Inaktivierung des Transkriptoms relativ zum HVC adulter Vögel. Welche Umstände mögen diesen Entwicklungssprung induziert haben?

Aus verhaltens- und entwicklungsbiologischer Sicht unterschieden sich ENTW-19 von ENTW-25 grundlegend von einander. Alle Tiere der Gruppe ENTW-19 befanden sich noch im Nest, während die der etwas älteren Gruppe ENTW-25 diesem bereits entfliegen waren. Die Vögel der Gruppe ENTW-25 waren somit anderen sensorischen Reizen ausgesetzt, wie vielfältigeren sozialen Interaktionen und auditorischen Stimuli, die für das Gesangslernen relevant waren. So ist bekannt, dass sich die Dichte an dendritischen Dornen im adulten HVC verringert, wenn man während der Aufzucht die Exposition der Vögel gegenüber adultem Gesang reduziert (Lauay et al., 2005). Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss auditorischen Inputs auf neuronale Genexpression beim Zebrafinken resultiert aus einer Studie an 20 Tage alten Vögeln. In diesem Alter induziert das Vorspielen arteigenen Gesangs nur sehr geringe Änderungen in der Genexpression in den auditorischen Bereichen des NCM, des FeldL2 und des CMM, während Gesang bei 100 Tage alten Tieren zu deutlichen Genexpressionsveränderungen führte (London et al., 2009).

Im Alter von etwa 25 Tagen beginnt beim Zebrafinken die sensorische Phase des Gesangslernen (Klaus Immelman, 1969; Böhner, 1990; Roper & Zann, 2006). Dies bedeutet, dass juvenile Zebrafinken mit Beginn dieses Zeitfensters das Gesangsmuster („*template*“) eines oder mehrerer Artgenossen memorieren (Eales, 1985). Bislang ist nicht hinreichend geklärt, inwieweit der HVC in die Verarbeitung des sensorischen Inputs, und damit in die „*template*“ - Bildung, involviert ist. Jedenfalls wird der HVC bereits in diesem Alter von auditorischen Kernarealen innerviert (Kelley & Nottebohm, 1979; Nottebohm et al., 1982; Wild, 1994; Foster et al., 1997; Appeltants et al., 2002; Shaevitz & Theunissen, 2007; Akutagawa & Konishi, 2010; Lynch et al., 2013) und könnte somit neuronalen Input erhalten, welcher sich auf seine Genexpression auswirken könnte.

Eine alternative Erklärung, die zu der Veränderung des Transkriptoms des HVC führen könnte, ist die Schließung der absteigenden motorischen Bahn des Gesangssystems. Sehr spät im Laufe der morphologischen Entwicklung des männlichen Gesangssystems, ca. 25-30 Tage nach dem Schlupf, wird der RA von Neuronen aus dem HVC innerviert (Mooney & Rao, 1994). Die Innervierung des RA könnte zur retrograden Regulation von Signalkaskaden führen, die die HVC-Genexpression verändern. Der Mechanismus, der die altersabhängige Innervierung ermöglicht, ist unklar, wobei ein östrogen-sensitiver Mechanismus eine Rolle spielen könnte (Holloway and Clayton, 2001). In diesem könnten die Östrogene die Genexpression im HVC direkt verändern (siehe 5.2.1 für eine detaillierte Diskussion der hormonalen Mechanismen). Da die motorische Aktivität, also erste Gesangsversuche, erst zwischen dem 25-30 Tag und zunächst auch nur sehr sporadisch auftreten, könnte die veränderte Genexpression im HVC eine Konsequenz des „Singens“ selbst sein. Trotzdem, könnten Entwicklungsmechanismen, die den HVC auf seine sensomotorische Funktion im Rahmen des Gesangslernens vorbereiten die veränderte Genexpression ab ca. dem 25 Tag erklären. Neben der oben erwähnten Innervierung des RA durch HVC Axone, ist hier auch der stetige Einbau neuer Neurone in den HVC zu nennen, wobei die Rate der Neurogenese mit steigendem Alter allerdings zurückgeht. Grundlage für die

Integration neuer Neurone in das bestehende Netzwerk bildet die Angiogenese, was im HVC adulter Kanarienvögel gezeigt werden konnte (Louissaint et al., 2002). Hinweise auf vergleichbare Prozesse im HVC sich entwickelnder Zebrafinken gab die Detektion zahlreicher Prozesse in den Stadien ENTW-25 bis ENTW100, welche im Zuge der Angiogenese eine Rolle spielen könnten. Hierbei handelte es sich um die Signalwege „*Ephrin reverse signaling* –“ und „*Integrin signaling pathway*“.

Welche weiteren Hinweise liefern die Gene bzw. Gennetzwerke hinsichtlich der Mechanismen, die mit den ontogenetischen Transkriptomveränderungen einhergehen? Die Entwicklungsstudie zeigte, dass sich in dieser frühen Phase neuronale Entwicklungsprozesse im Transkriptom widerspiegeln. Die Vögel der Gruppe ENTW-25 zeichneten sich insbesondere durch die Regulation von Genen aus, die mit Neurogenese und Axonogenese assoziiert waren. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Studien überein. So steigt die Anzahl der HVC-Neurone in diesem Alter besonders stark an (Kirn & DeVogd, 1989). Im Vergleich mit dem adulten HVC ist die Inkorporation neuer Neurone im juvenilen HVC erhöht (Nordeen & Nordeen, 1988), nimmt aber mit zunehmenden Alter ab (Wang et al., 2002; Pytte et al., 2007). Die Detektion der Axonogenese könnte mit der Innervierung des RA durch den HVC im Zusammenhang gestanden haben, die in diesem Alter beginnt (Mooney & Rao, 1994).

Am Anfang der sensorischen Phase des Gesangslernens ließ sich im HVC eine deutliche Veränderung der Expression von Kainatrezeptoren feststellen. Die Mehrzahl aller detektierten Untereinheiten erfuhr mit dem Übergang von ENTW-19 zu ENTW-25 eine Reduktion in der Expressionsstärke. Im Säugergehirn werden Kainatrezeptoren typischerweise in der frühen postnatalen Phase herabreguliert, wie Studien am Hippocampus und an thalamocorticalen Synapsen im Barrel Cortex der Nager belegen (Bahn et al. 1994; Kidd & Isaac 1999; Ritter et al., 2002), was mit der Reifung des Verarbeitungsprozesses sensorischer Reize im Zusammenhang steht (Kidd & Isaac, 1999; Kidd et al., 2002). Eine Inaktivierung der Kainatrezeptoren verändert die Freisetzung von Glutamat, was den Synchronisationsprozess der neuronalen Aktivität im Hippocampus induziert (Lauri et al., 2006).

In der sensomotorischen Phase des Gesangslernens gleichen die Zebrafinkenmännchen ihren Gesang dem „*template*“ an. Zeitgleich mit dem Übergang in die sensomotorische Phase, welche etwa 30 Tagen nach dem Schlupf beginnt und somit ENTW-30 entspricht, konnte die Expressionsangleichung von AMPA-, NMDA- und metabotropen Glutamatrezeptoruntereinheiten an das Niveau der adulten Kontrolltiere detektiert werden. Beide Rezeptortypen, AMPA-Rezeptoren vermitteln die schnelle, NMDA-Rezeptoren hingegen langsame exzitatorische Reizweiterleitung, sind maßgeblich am Prozess der synaptischen Plastizität (Malinow & Malenka, 2002), dem basalen Mechanismus des Lernvorgangs, beteiligt. Sie steuern den Beginn und das Fortschreiten kritischer Phasen und sind für die sexuelle Differenzierung neuronaler Systeme essentiell (Luján et al., 2005). Dies belegen zahlreiche Arbeiten am visuellen Cortex (Daw et al. 1999; Murphy et al. 2005; Tropea et al. 2006, 2009), zum „sexualdimorphen Nukleus der präoptischen Area“ (SDN-POA) (Hsu et al., 2005), zum Hippocampus (Martin et al., 1998), sowie zum Vermeidungs- und sexuellen Prägungsverhalten bei Hühnern (Daisley et al., 1998; Rose & Stewart, 1999; Nakamori et al., 2010; für

Übersichtsartikel: Herlenius & Lagercrantz, 2004). Da sich das Gesangssystem und vor allem der HVC durch einen sehr stark ausgeprägten Sexualdimorphismus auszeichneten, dessen geschlechtsspezifische Entwicklung im Altersbereich der drei jüngsten untersuchten Stadien sehr dynamisch verläuft (Nixdorf-Bergweiler, 1996; Gahr & Metzdorf, 1999), übernehmen möglicherweise auch hier Glutamatrezeptoren eine wichtige Funktion.

Glutamatrezeptoren des NMDA-Typs sind aus entwicklungsbiologischer Sicht von besonderer Bedeutung (Tovar & Westbrook, 1999; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Barria, 2007), und essentiell für das Gesangslernen (Singh et al., 2000; Boettiger & Doupe, 2001; Heinrich et al., 2002; Wada et al., 2004; Mooney & Prather, 2005; Thode et al., 2008). Für die Entwicklung in kritischen Phasen spielen vor allem die Untereinheiten *GRIN2A* und *GRIN2B* eine große Rolle, da eine Verschiebung der Expression ihren Beginn und Fortgang steuert (Fox et al., 1999; für Übersichtsartikel: Herlenius & Lagercrantz, 2004). Physiologisch hat der Anstieg des Expressionsverhältnisses von *GRIN2A* zu *GRIN2B* die Verkürzung der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Reizweiterleitung zur Folge. Dies ermöglicht ein präziseres und schnelleres Feuermuster (Fox et al., 1999) und bildet die Grundlage für den Prozess der Langzeitpotenzierung (Nase et al., 1999; Philpot et al., 2001), wobei andere Autoren *GRIN2A* und nicht *GRIN2B* für die Bildung von LTP anführen (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Exakt jene Veränderung trat im Übergang von ENTW-19 zu ENTW-25 zu Tage. Zwar wurde die stärkere Expression von *GRIN2A* relativ zu *GRIN2B* während des Gesangslernens im HVC bereits detektiert (Scott et al., 2004), die hier gewählten Altersstadien ermöglichten jedoch eine zeitlich deutlich genauere Datierung dieses kritischen Prozesses auf den Beginn der sensomotorischen Phase. Ein Rückgang der Expression von *GRIN2B* während der sensorischen Phase konnte auch im IMAN und der AreaX nachgewiesen werden, während *GRIN2A* im IMAN und der AreaX keine Veränderung im Expressionslevel zeigt (Basham et al., 1999; Singh et al., 2000; Heinrich et al., 2002; Scott et al., 2004). Diese Verschiebung ist für die Veränderung der elektrophysiologischen Merkmale in IMAN verantwortlich (Livingston & Mooney, 1997), und wird als Ursache für den graduellen Rückgang der Fähigkeit den Gesang zu ändern angeführt (Aamodt et al., 1995; Heinrich et al., 2002; Heinrich et al., 2003). Bemerkenswerterweise bleibt das Expressionsverhältnis von *GRIN2A* zu *GRIN2B* im HVC auch nach der Gesangslernphase (P100 und Adulte) stabil. Möglicherweise ist dies auf die erhöhte Plastizität des HVC zurückzuführen, die mit dem stetigen Einbau neuer Neurone im Zusammenhang steht (Alvarez-Buylla et al., 1990; Pytte et al., 2012). Untersuchungen an Ratten haben deutliche Hinweise dafür geliefert, dass *GRIN3B* motorneuronspezifisch expremiert wird und dort das Wachstum von Dendriten beeinflusst (Prithviraj & Inglis, 2008). Bemerkenswerterweise findet im HVC adulter Zebrafinken im Alter von vier bis 15 Monaten ein verstärktes Dendritenwachstum statt (McDonald & Kirn, 2012). Die relativ starke Expression von *GRIN3B* im HVC der adulten Kontrollgruppe stimmt damit überein. Hier wäre kritisch anzumerken, dass die Plastizität des Gesangs jung-erwachsener Zebrafinken und älterer Zebrafinken nicht gut untersucht ist. Die Untersuchungen, die die Stabilität des Gesangs erwachsener Zebrafinken stützen, sind mit eher einfachen gesangsanalytischen Methoden durchgeführt worden, die wenige Aussage über die Konstanz von Feinstrukturen der Gesangssilben erlauben.

Der Gesang juveniler Zebrafinken in der frühen sensomotorischen Phase zeichnet sich durch eine sehr hohe Variabilität aus, welche analog zur Entwicklungsphase beim Säuger mit einem erfahrungsbedingten Überangebot an Synapsen einhergehen könnte. Die Reduktion dieser überzähligen neuronalen Verbindungen („*synaptic pruning*“) im Gesangssystem des Zebrafinken findet im Zuge der Gesangsentwicklung statt, und ist für den IMAN ausführlich beschrieben (Nixdorf-Bergweiler et al., 1995; Wallhäusser-Franke et al., 1995; Bischof et al., 2002). Die Eliminierung dieser Strukturen kann durch apoptotische Prozesse gesteuert werden (Azevedo et al., 2009). Spezifisch bei den beiden ältesten Stadien wurde der Apoptosesignalweg „*FAS signaling pathway (CD95)*“ signifikant überrepräsentiert, welcher durch die Aktivierung von Caspasen, wie dem in beiden Stadien stark überexprimierten Gen *CASP8*, den programmierten Zelltod reguliert. Die Modifikation dieses Prozesses könnte zur Reifung des Gesanges im Zuge der sensomotorischen Phase beitragen, indem es Strukturen aus dem HVC entfernt, welche im Verlauf des Kristallisationsprozesses des Gesangs nicht mehr benötigt werden. Im Rahmen meiner Doktorarbeit musste ich die Analyse aus tierexperimentellen und aus finanziellen Gründen auf ein Gehirnzentrum beschränken, so dass es zu sehen bleibt, inwieweit ähnliche Änderungen in der Genexpression in HVC und IMAN stattfinden.

5.2. Hormonelle Effekte auf die Genexpression in der Entwicklung

5.2.1. Die Rolle von Östradiol bei der Entwicklung sexualdimorpher Gehirnstrukturen

Die Ursachen von Geschlechtsunterschieden im Gehirn von Wirbeltieren stehen zunehmend im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses (McCarthy & Arnold, 2011; Lenz et al., 2012). Bei Säugetieren werden gonadalen Geschlechtshormonen irreversible organisierende Effekte im neonatalen Gehirn und reversible aktivierende Wirkungen auf dessen geschlechtsspezifische Funktionen in einer späteren Lebensphase zugeschrieben ("*organizational/activational hypothesis*"; Phoenix et al., 1959; für Übersichtsartikel siehe: Wright et al., 2010; McCarthy & Arnold, 2011; Lenz et al., 2012). Dabei hat entsprechend der Aromatisierungs-Hypothese das im Gehirn aus Testosteron mit Hilfe der Aromatase gebildete Östradiol eine stärker maskulinisierende Wirkung auf die zentralnervöse Differenzierung als das Androgen allein (MacLusky & Naftolin, 1981; Wade, 2001). Dies scheint auch für das Gesangssystem der Singvögel zu gelten, da es bei juvenilen weiblichen Zebrafinken durch das nicht aromatisierbare Dihydrotestosteron und Östradiol nicht stärker maskulinisiert werden kann, als mit Östradiol alleine (Gurney & Konishi, 1980; Gurney, 1981; Jacobs et al., 1995), und das aromatisierbare Testosteron schwächer maskulinisierend wirkt als Östradiol (Grisham & Arnold, 1995).

Ein bei Nagetieren gut untersuchtes, sexuell dimorphes Gehirnareal ist die „präoptische Region“ (POA), deren „sexualdimorpher Nukleus“ (POA-SDN) bei männlichen Ratten ein Vielfaches des Volumens des weiblichen Tieres aufweist (Davis et al., 1996; Morris et al., 2004), während sich bei weiblichen Tieren der „Anteroventrale periventriculäre Nucleus“ (AVPV) stärker entwickelt (Orikasa et al., 2002). In beiden Kernen reguliert Östradiol die Entwicklung, indem es einerseits im männlichen SDN durch die verstärkte Expression von NMDA-Rezeptoren und des anti-apoptotisch wirkenden Gens „*B-cell lymphoma 2*“ (*BCL-2*) das Überleben von Neuronen ermöglicht (Tsukahara et al., 2006, 2008). Andererseits induziert Östradiol im AVPV männlicher Tiere die Expression von Caspasen in dopaminergen Neuronen und damit deren Apoptose (Waters & Simerly, 2009). Neben dem Zelltod beeinflusst Östradiol auch die Bildung dendritischer Dornen und bei Astrozyten das Wachstum von Zellfortsätzen, womit es zur sexuell dimorphen Entwicklung der POA beiträgt (Amateau & McCarthy, 2002a, 2002b, 2004). Auch in anderen Hirnregionen, die an der Steuerung des Sexualverhaltens von Nagetieren beteiligt sind und ebenfalls einen Geschlechtsdimorphismus aufweisen (Wu & Shah, 2011), reguliert Östradiol die geschlechtsspezifische Differenzierung. So stimuliert Östradiol im „ventromedialen Hypothalamus“ (VMH) die Ausschüttung von Glutamat, was zur verstärkten Bildung dendritischer Äste und Dornen führt (für Übersichtsartikel siehe: McCarthy, 2010). Weiterhin verändert Östradiol das Wanderungsverhalten von Neuronen im embryonalen Gehirn (für Übersichtsartikel siehe: Tobet et al., 2009).

Anders als bei Säugetieren, scheint gonadales Östradiol bei der geschlechtsspezifischen Differenzierung der Kerne des Gesangssystems nur eine modulierende Rolle zu spielen, während seine primären Ursachen zell-autonom und genetischen Ursprungs sind (Agate et al., 2003; für Übersichtsartikel siehe: Wade & Arnold, 2004; Gahr, 2007). So konnte bis dato kein Eingriff in die Wirkung gonadaler Geschlechtshormone die Demaskulinisierung des männlichen Gesangssystems hervorrufen (Mathews et al., 1988). Weiterhin führt zwar die Behandlung juveniler weiblicher Zebrafinken mit Östradiol zur Volumenvergrößerung der Kerne HVC und RA (Gurney & Konishi, 1980; Gurney, 1981; Pohl-Apel, 1985; Blair Simpson, 1991; Gahr & Metzendorf, 1999), jedoch ist das Gesangssystem genetischer Weibchen, bei denen die Entwicklung von Hodengewebe induziert wurde, nicht maskulinisiert (für Übersichtsartikel siehe: Wade & Arnold, 2004). Zu den modulierenden Effekten von Östradiol auf den HVC juveniler Zebrafinkenmännchen gehören die Stimulation der Expression des Androgenrezeptors im Alter von 11 Tagen (Kim et al., 2004; siehe aber dagegen: Thompson et al., 2011) und des Wachstumsfaktor *BDNF* („*Brain-derived neurotrophic factor*“) bei 18-30 Tage alten Vögeln (Dittrich et al., 1999). Auch scheint das Ausmaß der Innervierung des RA im Alter von 25-30 Tagen nach dem Schlupf durch den HVC von Östrogenen abhängig zu sein (Simpson, 1991; Holloway & Clayton, 2001). Somit kann Östradiol die Entwicklung des HVC bereits vor dem Beginn der Gesangslernphase modifizieren. Die globale Expressionsanalyse der vorliegenden Arbeit ergab jedoch, dass in Bezug auf die Anzahl signifikant regulierter Gene ältere Stadien eine höhere Östradiolsensitivität aufwiesen als jüngere. Leider geben Bluthormonwerte dieser Studie oder früherer Studien keinen Aufschluss über die Rolle von Östradiol für die gefundenen Transkriptomveränderungen in unbehandelten Tieren. Zudem könnte sich der Bluthormontiter

sehr deutlich von dem des Gewebes des HVC unterscheiden, was Arbeiten am Maushippocampus, welcher auch über alle zur Östradiolsynthese benötigten Enzyme verfügt, nahelegen (Hojo et al., 2009).

Im Rahmen der "*Organizational/activational hypothesis*" könnte man diesen altersbedingten Effekt aufgrund seiner zeitlichen Lage als aktivierende Östradiolwirkung bezeichnen. Unter allen dadurch signifikant veränderten biologischen Prozessen waren dabei solche am häufigsten vertreten, die Stoffwechselvorgänge, das Wachstum von Zellfortsätzen oder die Neurogenese beeinflussen.

Bei Zebrafinken konnte gezeigt werden, dass vermehrter Gesang den Sauerstoffverbrauch des Vogels erhöht (Franz & Goller, 2003). Von Dachsammern (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) ist bekannt, dass Testosteron die Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase, einem Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, stimuliert (Wennstrom et al., 2001). Da bei Zebrafinken die Gesangsaktivität durch Testosteron stimuliert wird (Arnold, 1975; Sossinka et al., 1975; Adkins-Regan, 1999; Hill et al., 2005) und beim Singen vermehrt Östradiol im posterioren Vorderhirn gebildet wird (Ramage-Healey et al., 2009), könnten die hier beschriebenen Östradioleffekte auf den Stoffwechsel im HVC mit den Erfordernissen oder Konsequenzen einer erhöhten Gesangsaktivität im Zusammenhang stehen. Im Speziellen könnte dies Veränderungen des Proteinmetabolismus induzieren, was in den vorliegenden Experimenten sowohl von Östradiol, als auch von Androgenen nachgewiesen werden konnte, wobei **dessen** assoziierte Gene durch eine siebentägige Östradiolbehandlung mehrheitlich verstärkt expremiert wurden. Weiterführende Versuche, deren Analyse eine Korrelation der von Östradiol abhängigen Veränderungen des HVC-Proteoms mit denen des Gesangsverhaltens erlauben würde, könnten zur Klärung des Sachverhaltes beitragen.

Neurogenese im HVC erfolgt bei juvenilen Zebrafinken in einem größeren Umfang als in älteren Vögeln (Wang et al., 2002) und verringert sich wenn der Gesang an Reife gewinnt (Wilbrecht et al., 2006). Bei den neu geborenen Nervenzellen handelt es sich um RA-projezierende Zellen (Nordeen & Nordeen, 1988), die mit zunehmenden Alter im HVC akkumulieren (Walton et al., 2012). Ihre Funktion für das Gesangsverhalten ist nicht bekannt. Während die fördernde Wirkung von Geschlechtshormonen auf die Neurogenese im HVC bei Vogelarten wie dem Kanarienvogel eine Rolle beim saisonal veränderten Gesangsverhalten zugewiesen wird (für Übersichtsartikel siehe: Nottebohm, 2002; Chen et al., 2013), könnte es sich bei der durch Östradiol verstärkten Neurogenese beim opportunistisch brütenden Zebrafinken um einen Atavismus handeln.

5.2.2. Östrogenrezeptoren als Regulationsmechanismen der Genexpression im HVC

Östradiol kann direkt und indirekt über genomische und membranständige Mechanismen die Genexpression im HVC beeinflussen. Der klassische Mechanismus hormoneller Genregulation besteht in der Bindung des Sexualhormons (Ligand) an einen spezifischen Rezeptor, welcher sich meist schon im Kern befindet oder aus dem Zytoplasma dorthin transloziert. Dort aktiviert er die Transkription, was einer erweiterten Form der „*two step theory*“ entspricht (Jensen et al., 1968). Bislang wurden mit dem Östrogenrezeptor alpha ("*estrogen receptor*", *ESR1*, *ER-α*) und -beta (*ESR2*, *ER-β*) zwei Rezeptoren identifiziert (Jensen, 1962; Toft & Gorski, 1966; Kuiper et al., 1996), welche östrogenabhängig diesen Regulationsmechanismus vermitteln. Der Rezeptor befindet sich in seiner nativen Form im Kern oder Zytoplasma, gebunden an inhibitorische Chaperone, wie Hitzeschockproteine (z.B. *HSP90*). Ihre Aufgabe besteht darin, den Rezeptor in seiner inaktiven Konformation zu halten, und jegliche DNA Bindungs- und somit Transkriptionsfaktoraktivität zu unterbinden (Knoblauch & Garabedian, 1999). Bindet ein Steroidhormon eine Bindungsdomäne des Rezeptors, vollzieht dieser eine Konformationsänderung. Östrogenrezeptor und Chaperone dissoziieren und der Rezeptor-Liganden Komplex wird mittels Importinen in den Zellkern geschleust („*step one*“). Dort geht er mit weiteren Rezeptoren Dimerbindungen ein, welche im Fall von Östrogenrezeptoren als Homo- (*ER-α* + *ER-α*) oder Heterodimere (*ER-α* + *ER-β*) auftreten können (Cowley et al., 1997; Bourguet et al., 2000; Gampe et al., 2000). Schließlich bindet der dimerisierte Rezeptorkomplex eine spezifische Sequenz (*estrogen responsive element*, ERE) in der Promotoregion von Zielgenen („*step two*“). Sowohl *ER-α*, als auch *ER-β* interagieren mit der identischen Sequenz und können somit redundante Rollen bei der östrogeninduzierten Genexpression übernehmen (Hall et al., 2001).

Im Gesangssystem der Zebrafinken wird der *ER-α* lediglich im ventro-medialen Teil des HVC expremiert (Gahr & Konishi, 1988; Jacobs et al., 1996; Gahr, 1996; Gahr & Metzdorf, 1997; Jacobs et al., 1999), sowie im dorsalen Außenring des RA (Gahr, 1993), wo axonale Endigungen RA-projezierender HVC-Neurone auf ein Signal zur Innervierung warten (Konishi & Akutagawa, 1985; Mooney & Rao, 1994). *ER-α* sind in diesen Regionen bereits in der kritischen Phase der Östradiolsensitivität des Gesangssystems expremiert (Gahr et al., 1993). Für die Möglichkeit einer indirekten Wirkung von Östradiol auf die Genexpression im HVC spricht die Bildung der *ER-α* und -*β* im caudomedialen Nidopallium (NCM) (Jeong et al., 2011; Tremere et al., 2012; Remage-Healey et al., 2013), einer auditorischen Region, die mit dem HVC verschaltet ist (Bauer et al., 2008; für Übersichtsartikel siehe: Hahnloser & Kotowicz, 2010; Prather, 2013). Im Vorderhirn der Zebrafinken wird mittels östrogener Aktivierung via *ER-β* die Verarbeitung auditorischer Informationen modifiziert (Tremere et al., 2012).

Im Gegensatz zum klassischen Wirkungsmechanismus durch Östradiol induzierter Genexpression treten nicht-genomische Expressionseffekte innerhalb von wenigen Minuten nach Veränderung des Hormontiters auf (Migliaccio et al., 1996; Pradhan et al., 2008; Yuen et al.,

2011; Heimovics et al., 2012; Remage-Healey et al., 2012; Remage-Healey & Joshi, 2012; Chao et al., 2014). Verantwortlich hierfür sind membranassoziierte Rezeptoren, die zahlreiche Mechanismen der Signaltransduktion, wie die Rekrutierung intrazellulärer Calciumionen (Wu et al., 2011) und die Aktivität von Phospholipasen (Zivadinovic et al., 2005) und Adenylatcyclasen (Ropero et al., 2002) regulieren. Zudem aktivieren sie Signaltransduktionskaskaden, wie den *MAPK*- (*Mitogen activated protein kinase*; (Wu et al., 2011) und den *PI3K*- (*Phosphatidylinositol 3-OH kinase*-) Signalweg (Pedram et al., 2002). Obgleich die Existenz dieser membranassoziierten Rezeptoren bereits seit einigen Jahren postuliert wird, herrscht eine rege Diskussion zu möglichen Kandidaten (für Übersichtsartikel siehe: Soltysik & Czekaj, 2013). Nach heutigem Wissen beruhen zwei Rezeptoren (*mER-α* und *mER-β*) sehr wahrscheinlich auf den identischen Transkripten, welche auch für die Kernrezeptoren *ER-α* und *ER-β* codieren (Razandi et al., 1999; Pedram et al., 2006).

Als weiterer Kandidat für die östrogenvermittelte Signaltransduktion membranständiger Rezeptoren gilt „*G-protein receptor 30*“ (*GPR30*, *GPER1*), obgleich in zahlreichen Studien eine östrogenabhängige Signaltransduktion via *GPR30* bezweifelt wird (für Übersichtsartikel siehe: Langer et al., 2010; Soltysik & Czekaj, 2013). *GPR30* zählt zu den heptahelikalen g-Protein gekoppelten Rezeptoren und wurde in den 1990er Jahren zunächst als „*orphan receptor*“ beschrieben (O'Dowd et al., 1998). Hinweise für die Bindungsfähigkeit von Östrogenen erfolgte einige Jahre später (Filardo et al., 2002; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Bislang ist jedoch ungeklärt, welches Steroid den physiologischen Hauptliganden für *GPR30* bildet, da sowohl Östradiol als auch Aldosteron ähnliche Bindungsaffinitäten aufweisen und konzentrationsabhängig ähnliche Mechanismen aktivieren (Gros et al., 2011). *GPR30* ist an einer enormen Bandbreite an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt, was unter anderem auf die Fähigkeiten zurückzuführen ist, Calcium-Ionen mobilisieren (Revankar et al., 2005), die cAMP- (zyklisches Adenosinmonophosphat) Produktion stimulieren, mit Wachstumsfaktoren („*Epidermal growth factor receptor*“, *EGFR*), („*Insulin-like growth factor 1 receptor*“, *IGF-1R*) interagieren und Signalkaskaden (*PI3K*, *AKT/BAD*, *MAPK* und *eNOS*) aktivieren zu können (Vivacqua et al., 2006; Filice et al., 2009; Lappano et al., 2013). Für HVC wurde mittels immunhistologischer Färbung eine entwicklungsgekoppelte Zunahme der Proteinexpression von *GPR30* bis zum 45-ten Tag nach dem Schlupf nachgewiesen (Acharya & Veney, 2011). Allerdings konnte ich das in dieser Publikation veröffentlichte Expressionsmuster von *GPR30* im Vorderhirn von Zebrafinkenmännchen mit Hilfe von *in situ* Hybridsierungen, bei denen eine für Zebrafinken spezifische Sonde verwendet wurde, nicht bestätigen (unveröffentlichte Daten).

Die Methode, welche zur Applikation des Östradiol in den ein-, wie den siebentägigen Experimenten verwendet wurden, lässt eine Differenzierung zwischen genomischen und nicht-genomischen Wirkungsmechanismen nicht zu. Kürzere Expositionszeiten gegenüber Östradiol, wie sie durch die Applikation einer Östradiol-haltigen Creme möglich wären (zum Vergleich siehe für Melatonin-Creme: Goymann et al., 2008), würden in Anschlussarbeiten die Erforschung nicht-genomischer Östradioleffekte auf den HVC erleichtern. Weiterhin ließen sich die vorgelegten Ergebnisse nicht direkter oder indirekter Östradiolwirkung zuordnen. Eine parenchymale Platzierung von Östradiolimplantaten in der Nähe des HVC (vgl. Alward et al.,

2013) könnte in weiterführenden Studien eine Detektion direkter Wirkungen von Östradiol auf den HVC ermöglichen.

5.2.3. Östrogeninduzierte Mechanismen im HVC vor und zu Beginn der Gesangslernphase

Der HVC ist bei männlichen Zebrafinken bereits ca. zehn Tage nach dem Schlupf durch die Expression des Androgenrezeptors (Gahr & Metzdorf, 1999; Kim et al., 2004) und einige Tage später im medialen Teil durch die Expression des Östrogenrezeptors alpha (Gahr, 1996; Jacobs et al., 1999) charakterisierbar. So wie die Behandlung mit Östradiol ab dem dritten Tag nach dem Schlupf die Expression des Androgenrezeptors im männlichen HVC am Tag 25 reduziert (Thompson et al., 2011), konnte auch hier bei juvenilen Männchen eine durch Östradiol verringerte Expression des Androgenrezeptors beobachtet werden. Allerdings wurde eine vergleichbare Wirkung auf den HVC elf Tage alter Männchen auch für den Aromataseblocker Fadrozol berichtet (Kim et al., 2004), während in den hier vorgelegten Daten kein Effekt der zwölfwöchigen Behandlung mit Fadrozol auf die Expression des Androgenrezeptors im HVC am Tag 30 zu entnehmen war. Es bleibt daher fraglich, ob endogenes Östrogen eine Funktion bei der Regulation der Expression des Androgenrezeptors während der Frühentwicklung des HVC ausübt. Allerdings führt die Östradiolbehandlung junger Zebrafinken zu einem Stop der Entwicklung des HVC Transkriptoms, was durch eine Reduktion der Expression von Androgenrezeptoren erklärt werden könnte.

Erste morphologische Geschlechtsunterschiede im HVC von Zebrafinken zeigen sich bei Nissl-gefärbten Gehirnschnitten im Alter von ca. 20 Tagen (Nixdorf-Bergweiler, 1996), wobei der HVC männlicher Tiere ein größeres Volumen als der weiblicher aufweist. Allerdings könnten lediglich 30 bis 40% des späteren HVC-Volumens auf östrogene Einflüsse zurückgeführt werden (Gahr & Metzdorf, 1999). Ein von Östrogen beeinflusster Parameter des HVC scheint die Somatagröße der HVC-Neurone zu sein. So ist diese am Tag 25 reduziert, wenn nach dem Schlupf täglich der Östrogenrezeptorblocker ICI 182,780 intrakranial injiziert wird (Bender & Veney, 2008).

Parallel zur sexualdimorphen Entwicklung des HVC-Volumens nach Tag zehn nimmt die Anzahl der HVC-Neurone bei Männchen stärker zu als bei Weibchen (Bottjer et al., 1985; Nordeen & Nordeen, 1988; Kirn & DeVoogd, 1989). Zwar ist die Wirkung von Östradiol auf die Inkorporation neuer Neurone in den juvenilen HVC bei männlichen Zebrafinken nicht bekannt, jedoch führt die Behandlung mit Östradiol bei Weibchen zu einem Anstieg der Anzahl neu geborener Neurone (Nordeen & Nordeen, 1989; Burek et al., 1995). Beim Einbau dieser Nervenzellen in den HVC spielen neben der Neurogenese selbst auch Vorgänge im Rahmen der Rekrutierung einwandernder Nervenzellen eine Rolle. Bei adulten Kanarienvogelweibchen scheint Östradiol alleine die Entstehung neuer Nervenzellen nicht zu beeinflussen (Brown et al., 1993; Yamamura et al., 2011), dafür aber die Sensitivität des Kapillarendothels gegenüber dem

mitogen wirksamen *VEGF* („*Vascular endothelial growth factor*“) durch die Stimulation des (*VEGF*)-Rezeptors *VEGFR2* („*Kinase insert domain receptor*“) zu erhöhen (Louissaint et al., 2002). Es wird vermutet, dass das vom HVC-Endothel vermehrt freigesetzte Protein *BDNF* das Überleben der einwandernden Neurone unterstützt (für Übersichtsartikel siehe: Chen et al., 2013). In der vorliegenden Studie konnten in den Altersgruppen bis Tag 30 weder Neurogenese, noch Angiogenese als östrogeninduzierte biologische Prozesse detektiert werden. Dafür, dass eine längerfristige Östradiolbehandlung in dieser Phase die Entwicklung des Kapillarsystems im HVC fördert, sprach das HVC-Transkriptom der für sieben Tage behandelten Vögel, bei denen am Tag 25 die Expression des *VEGFA* und seines Rezeptors *KDR* erhöht war (**Tab. 4.28**), und der *VEGF*-Signalweg als überrepräsentiert detektiert wurde (**Tab. 4.18**).

Bei der Innervierung des RA durch Projektionsneurone des HVC zwischen Tag 20 und 30 (Konishi & Akutagawa, 1985; Mooney & Rao, 1994; Foster & Bottjer, 1998) scheint Östrogen eine fördernde Rolle zu spielen. So schwächt sich diese Innervierung in Gewebekulturen von 25 Tage alten Männchen in der Gegenwart von Fadrozol ab und verstärkt sich bei Weibchen durch die Zugabe von Östradiol (Holloway & Clayton, 2001). Im HVC-Transkriptom führte die Östradiolbehandlung bei 19 bzw. 25 Tagen alten Männchen zur Überrepräsentation der biologischen Prozesse "*Cell projection organization*" und "*Cytoskeleton organization*" (**Tab. 4.15**; **Tab. 4.19**). Darüber hinaus konnte "*Axon guidance*" nach Östradiolbehandlung unabhängig von deren Dauer als stark überrepräsentierter neuronaler Prozess beobachtet (**Tab. 4.16**; **4.20**) und nach zwölf-tägiger Behandlung mit Östradiol bzw. Fadrozol als der am Tag 30 am stärksten überrepräsentierte und gegenläufig veränderte neuronale Prozess detektiert werden (**Abb. 4.11**). Wobei die Analyse des letzteren Versuchs ergab, dass Östradiol eine Stimulation der Expression des *EGF* - Rezeptors (*EGFR*) bewirkte, dem Schlüsselgen des hier beschriebenen Netzwerkes "*Axon guidance*" (**Abb. 4.11**). Unter Berücksichtigung einer stimulierenden Wirkung von Östradiol auf die RA-Innervierung durch den HVC (Holloway & Clayton, 2001) scheint die durch Östradiol verstärkte Expression des *EGFR* im HVC im Widerspruch zu Ergebnissen bei Granulazellen des Nagercerebellums zu stehen. Dort verhindert *EGFR in vitro* die Ausbildung von Neuriten (Povlsen et al., 2008). Jedoch stimulierte Östradiol im gleichen Versuch auch die Expression von *NCAM1*, das bei Nagern die Wirkung des *EGFR* auf das Neuritenwachstum der Granulazellen verhindert.

Neben einem Einfluss auf die Verschaltung von HVC und RA könnte die Detektion dieser biologischen Prozesse nach Östradiolbehandlung aber auch auf eine östradiole Wirkung auf die Innervierung des HVC selbst hindeuten. Allerdings scheint die Innervierung des HVC z.B. durch acetylcholinerge (Sakaguchi & Saito, 1991) und catecholaminerge (Soha et al., 1996) Fasern erst nach Tag 30 an Bedeutung zu gewinnen. Die frühe Entwicklung des HVC-Innervierungsmuster durch Fasern aus auditorischen Gebieten wurde noch nicht beschrieben, obwohl dieser Aspekt Berücksichtigung verdiente, da sich Östrogenwirkungen im caudalen Nidopallium auf den HVC auswirken (Chao et al., 2014; Pawlisch & Remage-Healey, 2015).

So wie der Gesang von Zebrafinkenmännchen, die ab Tag 20 mit Tamoxifen, einem Partialantagonisten des Östrogenrezeptors, behandelt werden, die zeitliche Stereotypy vermissen lässt (Bottjer & Hower, 1992), verlängert die Gabe von Östradiol bei anderen Arten, wie der Singammer (*Melospiza melodia*) und der Sumpfsammer (*Melospiza georgiana*) die Dauer

der sensomotorischen Phase und verhindert die Kristallisation des Gesangs (Marler et al., 1987, 1988). Auf diesen Beobachtungen fußt die Hypothese, dass Östrogen die Plastizität des Gesangs befördert, und somit seine Reifung bis hin zur Kristallisation hemmt (Bottjer & Johnson, 1997; Schlinger, 1997). Dies wird durch den Effekt der Östradiolbehandlung der juvenilen Zebrafinkenmännchen gestützt, welche zu einem Stopp der Entwicklung des Transkriptoms des HVC führte: In der vorliegenden Arbeit konnte anhand ausgewählter Gene, die für Neurotransmitterrezeptoren codieren, gezeigt werden, dass eine siebentägige Behandlung mit Östradiol die Reifung des Expressionsmusters im HVC bei einigen Rezeptoruntereinheiten verhinderte und bei anderen beschleunigte. Berücksichtigte man allerdings das gesamte HVC-Transkriptom bei Vögeln, die für zwölf Tage mit Östradiol bzw. Fadrozol behandelt wurden, ließ sich diese Hypothese bestätigen. Während Östradiol der Reifung des Transkriptoms entgegen wirkte, wurde sie durch eine Behandlung mit Fadrozol gefördert (**Abb. 4.10**). Die Tatsache, dass die siebentägige Behandlung der beiden ältesten Gruppen in ähnlicher Weise zur Juvenilisierung des HVC-Transkriptoms führte (**Abb. 4.9**), wird im folgenden Paragraphen näher diskutiert.

5.2.4. Funktionen von Östrogen in der Entwicklung des HVC während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens

Der Zebrafink wird zu den opportunistischen Brütern gezählt, was bedeutet, dass sein Reproduktionszyklus nicht an sich regelmäßig verändernde jahreszeitliche Bedingungen gekoppelt ist, sondern von der Verfügbarkeit von Ressourcen determiniert wird (Zann, 1996). Im Gegensatz zu saisonal brütenden Singvögeln, deren Gesangssystem hormonbedingt starken strukturellen Veränderungen unterliegt (Tramontin & Brenowitz, 2000; Tramontin et al., 2003; Fusani & Gahr, 2006), bleiben bei Zebrafinkenmännchen HVC-Volumen und -Zellgröße nach der Kristallisation des Gesangs unverändert (Herrmann & Bischof, 1986; Nixdorf-Bergweiler, 1996). Auch das Transkriptom des adulten HVC weist nur wenig Anzeichen für Proliferation, Wachstum und Plastizität auf (Lovell et al., 2008). Dagegen konnte die vorgelegte Entwicklungsstudie zeigen, dass sich im HVC subadulter Vögel biologische Prozesse wie Neurogenese und Axonogenese verändern (**Tab. 4.7**).

Die Erwartungshaltung zur Entwicklung der Sensitivität des HVC-Transkriptoms gegenüber Östradiol war durch die Ergebnisse der Entwicklungsstudie bedingt, bei der die größten Veränderungen des männlichen HVC-Transkriptoms zwischen Tag 19 und 30 zu beobachten waren (**Abb. 4.2; Tab. 4.7**), und der Tatsache, dass der weibliche HVC hauptsächlich in der Frühphase seiner Entwicklung durch Östradiol maskulinisierbar ist (Gurney & Konishi, 1980; Simpson, 1991; Adkins-Regan et al., 1994). Die Hormonstudie ergab jedoch, dass die Sensitivität des männlichen HVC-Transkriptoms gegenüber Östradiol mit dem Alter anstieg (**Abb. 4.4**). Messungen zur endogenen Östrogenkonzentration in diesem Entwicklungsstadium liegen für den HVC leider nicht vor, aber im NCM, einer dem HVC benachbarten auditorischen Region,

nimmt die Östradiolkonzentration ebenfalls am Ende der Gesangslernphase zu (Chao et al., 2014).

Zu den infolge der Östradiolbehandlung hoch signifikant veränderten biologischen Prozessen, die nicht zu Beginn des Gesangslernens, sondern am Tag 50 und 100 zu beobachten waren, zählten z.B. "*Neuron projection development*" (1Tag-Ö₂; **Tab. 4.15**) bzw. "*Cell projection morphogenesis*" (7Tage-Ö₂; **Tab. 4.19**). Dies stellt eine bereits beim Säugetier untersuchte neuronale Antwort auf Östrogen dar (für Übersichtsartikel siehe Arevalo et al., 2011). Prozesse wie Lipidmetabolismus und Ubiquitin-abhängiger Proteinkatabolismus, die während der Entwicklung nur bei den jüngeren Gruppen gegenüber der adulten Kontrollgruppe verändert waren (**Tab. 4.7**), wurden nach siebentägiger Behandlung nicht nur am Tag 25 sondern ebenso an den Tagen 50 und 100 verändert (**Tab. 4.20**).

Östrogenabhängige Neuritogenese im HVC der 50 und 100 Tage alten Zebrafinken könnte mit dem Vorgang der Neurogenese im Zusammenhang stehen, die im HVC männlicher Zebrafinken lebenslang erfolgt (Nordeen & Nordeen, 1988; Wang et al., 2002; Wilbrecht et al., 2006) und zu einer Verdopplung RA-projezierender Neurone im adulten Vogel führt (Walton et al., 2012), obwohl sich der Gesang nach seiner Kristallisation nicht mehr verändert (Zann, 1996). Alternativ könnte die Neuritogenese aber auch existierende HVC-Neurone betreffen. Ein weiterer Mechanismus für die verstärkte Neurogenese kann auf die Regenerationsfähigkeit des Gehirns zurückgeführt werden. So reagiert das Zebrafinkengehirn auf Verletzungen, z.B. durch künstlich herbeigeführte Traumata, durch eine verstärkte Aromatasesynthese in Gliazellen (Schlinger et al., 1994) und somit mit einer erhöhten Produktion von Östradiol, welches neuroprotektiv, reparierend wirkt und die Neurogenese fördert (für Übersichtsartikel siehe: Saldanha et al., 2009; Duncan et al., 2013). Da durch Östradiol stimulierte Neurogenese in erster Linie im HVC 50- und 100 Tage alter Vögel als signifikant veränderter biologischer Prozess detektiert werden konnte, nicht aber bei jüngeren Stadien, könnte dieser Effekt von Östradiol im HVC altersabhängig sein.

Betrachtete man speziell neuronale Prozesse, die durch eine siebentägige Östradiolbehandlung in den beiden älteren Gruppen betroffen waren, so betraf dies neben der Entwicklung von Zellfortsätzen tatsächlich auch die Neurogenese und die Orientierung axonalen Wachstums (**Tab. 4.20**). Der Einfluss von Östrogen auf die Neurogenese im HVC ist bereits von Kanarienvogelweibchen bekannt, bei denen allerdings Östrogen nur im Zusammenspiel mit Androgenen einen Einfluss auf die Neurogenese ausübt (Yamamura et al., 2011). Dagegen schien bei Zebrafinkenmännchen allein Östrogen, nicht aber DHT die Neurogenese nach sieben Tagen zu verändern (Kapitel 4.4.1). Dies könnte auf Artunterschiede in der Komplexität der genomischen Sensitivität gegenüber Geschlechtshormonen zurück zu führen gewesen sein. So weisen Kanarienvögel eine größere Anzahl an Promotoren mit einem "*estrogen responsive element*" auf als z.B. der Zebrafink (Frankl-Vilches et al., 2015). Allerdings bleibt einzuschränken, dass eine Zunahme der Neurogenese im HVC unter Östradiolbehandlung bei älteren Zebrafinken bisher nicht direkt beobachtet wurde und viele Gene, die mit Neurogenese zu tun haben, auch in anderen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Problematisch für die Tragweite der hier beobachteten Östradioleffekte ist weiterhin, dass die siebentägige Östradiolbehandlung

während der sensomotorischen Gesangslernphase positive Rückkopplungen auf der Ebene der Östrogenrezeptoren hervorrief (**Tab. 4.23**), was unphysiologische Transkriptomveränderungen des subadulten HVC hervorgerufen haben könnte.

5.3. Zusammenfassung

5.3.1. Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression im sensomotorischen Kern HVC des Gesangssystems von Zebrafinkmännchen mit Hilfe der Microarraytechnologie untersucht. Dafür grundlegend war die Sequenzierung des Zebrafinkengenoms im Jahre 2010 (Warren et al., 2010). Bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit lagen nur wenige Informationen zur funktionellen Annotation dieses Genoms vor, was eine kohärente bioinformatische Analysen auf der Basis des Zebrafinkentranskriptoms unmöglich machte. Um dennoch die molekulargenetischen Vorgänge im HVC während der Entwicklung und infolge der Manipulation des hormonellen Milieus untersuchen zu können, wurden die signifikant regulierten Zebrafinkensequenzen orthologen Sequenzen des gut annotierten humanen Genoms zugeordnet. Es ließ sich somit nicht ausschließen, dass ein Gen unter Umständen dem falschen Signalweg und biologischen Prozess zugeordnet wurde. Für die große Mehrheit der Gene war davon nicht auszugehen. Für weitere Studien wäre allerdings eine bessere Annotation des Zebrafinkengenoms wünschenswert.

Das Hauptziel der Arbeit bestand darin, mittel- und langfristige Effekte von Östradiol im HVC männlicher Zebrafinken zu analysieren. Die Behandlung der Zebrafinken erfolgte dabei durch die Implantation eines Hormon- (Dihydrotestosteron, Östradiol, Testosteron) oder Fadrozolpellets unter der Rückenhaut der Vögel, und war somit systemisch. Die hier beobachteten Effekte können daher durch Wirkungen auf den HVC selbst und/oder mit dem HVC verbundenen Gehirnregionen verursacht worden sein. Damit glich der Wirkungsmechanismus der Hormonimplantate demjenigen endogener Hormone gonadalen Ursprungs. Bei weiterführenden Studien könnten auch alternative Applikationsweisen zur Anwendung kommen, wie die lokale Implantation im Parenchym. Mit ihr ließe sich die lokale Hormonsynthese im Gehirn simulieren. Zu Beginn dieser Arbeit lagen allerdings diesbezüglich keine gesicherten Informationen vor. Aufgrund der geringen Körpergröße mancher Altersstadien wurde von der Verwendung einer osmotischen Pumpe oder eines Dialysesystems abgesehen.

Bei der experimentellen Veränderung des hormonellen Milieus spielen Dosis und Behandlungsdauer eine wichtige Rolle. Um eine Vergleichbarkeit dieser Arbeit zu gewährleisten, orientierte sich die Menge an implantiertem Hormon/Fadrozol an bereits zuvor durchgeführten Studien (Simpson & Vicario, 1991; Dittrich et al., 1999, 2013; Tang & Wade, 2012). Überraschend groß fiel beim Vergleich der beiden Behandlungszeiten der Anteil der Gene aus, der gegenläufig reguliert war. Hierbei könnte es sich um eine hormoninduzierte Veränderung der Physiologie gehandelt haben, auf welche die Versuchstiere zur Einhaltung der Homöostase zunächst durch eine Inhibition der Genexpression (Eintagesbehandlung) und später durch eine erhöhte Genexpression (Siebentagesbehandlung) reagierten.

5.3.2. Transkriptome und Entwicklungsphasen

Die Analyse der fünf untersuchten Altersgruppen veranschaulichte, dass der Entwicklungszeitpunkt sich deutlich stärker auf die Ähnlichkeit der HVCs auswirkte als das Alter der Tiere. Dies trat vor allem beim Vergleich der jüngsten untersuchten Gruppen zu Tage. Im Rahmen der Entwicklungsstudie wurde beobachtet, dass sich der HVC bei allen Stadien der Gesangslernphase durch eine starke Überrepräsentation des anti-apoptotischen *AKT(PKB)-BAD* - Signalweges gegenüber der adulten Kontrollgruppe auszeichnete, wobei allerdings die Mehrzahl seiner Gene herabreguliert war. Zudem unterschieden sich die beiden Gruppen ENTW-50 und -100 durch einen pro-apoptotischen Signalweg ("*FAS signaling pathway*") von den übrigen Vögeln. Apoptose im HVC von Zebrafinkenmännchen während des Gesangslernens steht damit im Einklang, dass sich sein Volumen in und nach der sensomotorischen Phase des Gesangslernens nicht mehr verändert (Herrmann & Bischof, 1986; Nixdorf-Bergweiler, 1996), obwohl der HVC von Zebrafinkenmännchen lebenslang Neurogenese aufweist (Walton et al., 2012). Auffallend traten in der Entwicklungsstudie deutliche Veränderungen der Genexpression zu Tage. Diese könnten Entwicklungsprozesse in der frühen sensorischen Phase erklären. Hier zu nennen ist die Überrepräsentation neuro- und axonogenetischer Prozesse, welche den Innervierungsprozess abbilden könnten, sowie die deutliche Expressionsveränderung zahlreicher Glutamatrezeptoruntereinheiten beim Übergang in die sensorische Phase.

5.3.3. Funktionen von Östrogen im HVC

Basierend auf Untersuchungen zum Gesangsverhalten und Östrogentiter des Blutplasmas von Sumpffammern (*Melospiza georgiana*) (Marler et al., 1987) formulierte Barney Schlinger (Schlinger, 1997) die Hypothese: "*Estrogens may help maintain the plasticity of the song system that is required for the acquisition of new sensory models of song*". In Übereinstimmung mit einer die neuronale Plastizität fördernden Rolle von Östrogen konnte hier erstmals gezeigt werden, dass eine chronische Östradiolbehandlung die Reifung des HVC-Transkriptoms hemmt. Fragen nach den proximalen zellulären Mechanismen, die diesem Östradioleffekt zugrunde liegen, und ob damit auch das Fenster zum Erlernen des Tutorgesangs länger offen gehalten wird, sollten durch weiterführende Studien beantwortet werden. Dabei bietet die Beobachtung, dass eine längerfristige Östradiolbehandlung die Expression von Genen mehrheitlich stimuliert, während sie durch eine kurzfristige primär gehemmt wird einen experimentellen Ansatzpunkt zum Studium der Wirkungsmechanismen. So scheint es lohnenswert Gene, die an einem Übergang zwischen diesen beiden Zuständen ursächlich beteiligt sind, näher zu untersuchen.

Analog zu den Vorgängen im Säugetiergehirn, markierte im HVC von Zebrafinkenmännchen eine Expressionsänderung bei den NMDA-Rezeptoruntereinheiten *GRIN2A* und *GRIN2B* den Beginn der kritischen Periode des Gesangslernens. Eine eintägige Östradiolbehandlung stellte sich als ausreichend heraus, um während des Gesangslernens im

Alter von 50 Tagen die Expressionsverhältnisse der NMDA-Rezeptoruntereinheiten grundlegend zu verändern. Ihre Auswirkungen auf die neuronale Aktivität und Plastizität des HVC können jedoch kaum vorhergesagt werden, und bedürfen einer experimentellen Bestimmung. So sind östrogene Effekte auf die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren bei Nagern, z.B. im sexual dimorphen ventromedialen Kern des Hypothalamus, nicht zu beobachten, oder weichen wie im Hippocampus von denen im HVC des Zebrafinken ab (für Übersichtsartikel siehe: Schwarz & McCarthy, 2008). Möglicherweise stellt die Regulation der NMDA-Rezeptoruntereinheiten eine der zentralen Wirkungsmechanismen dar, durch den Östradiol die Reifung des HVC-Transkriptoms kontrollieren kann.

Nach siebentägiger Östradiolbehandlung änderte sich beim den *AKT(PKB)-BAD-signaling* Signalwegen, der insbesondere bei der Gruppe 7Tage-Ö₂-25 am stärksten überrepräsentiert war, das Verhältnis der herauf- zu den herabregulierten Genen dramatisch zugunsten eines anti-apoptotischen Effektes. Welche Zelltypen in welchen Stadien davon betroffen waren muss noch im Detail untersucht werden. Hinweise auf den *VEGF*-Signalweg deuteten jedoch daraufhin, dass die anti-apoptotische Östradiolwirkung zu Beginn des Gesangslernens mit der Entwicklung des Kapillarsystems im Zusammenhang stehen könnte.

Am Ende der Gesangslernphase führte die siebentägige Östradiolbehandlung zunehmend zur signifikanten Veränderung der Genexpression im HVC, wobei der Anteil an herabregulierten Genen zunahm. Bezüglich Neurogenese und Neuritogenese war allerdings am Tag 100 die Anzahl heraufregulierter Gene noch immer doppelt so hoch wie die der herabregulierten. Fraglich ist, ob diese beiden Prozesse mit der Produktion von gerichtetem Gesang im Zusammenhang steht, der bei adulten Männchen dann vermehrt beobachten werden kann, wenn sie mit östrogenen Metaboliten behandelt werden (Walters et al., 1991). Wahrscheinlicher erscheint, dass diese bei subadulten Zebrafinken durch eine chronische Östradiolbehandlung verursachten Vorgänge keine physiologischen Reaktionen des HVC darstellen. Vielmehr sind sie die Folge einer im HVC unvollständig gehemmten Genomsensitivität gegenüber Östrogen, die in anderen Gehirnregionen konserviert werden müssen. So sind Zebrafinken opportunistische Brüter, die ihre Brut sehr schnell nach dem Einsetzen permissiven Bedingungen beginnen. Dabei ist Östrogen bekannt dafür, dass es einen fördernden Einfluss auf das Fortpflanzungsverhalten von Zebrafinkenmännchen hat (Harding et al., 1983).

5.3.4. Ausblicke

Nach einer Östradiolbehandlung konnten im HVC-Transkriptom männlicher Zebrafinken zahlreiche signifikant überrepräsentierte kanonische Signalwege und biologische Prozesse detektiert werden. Im Zentrum dieser Netzwerke standen wenige Gene, welche basierend auf rezenter Annotation weitere Gene direkt oder indirekt regulieren. Diese Schlüsselgene bieten sich für Folgestudien als Kandidatengene zum Nachweis eines östrogenen Einflusses auf den HVC an.

Darüber hinaus bieten sich diese Gene in Folgestudien dafür an, die hier gefundenen Ergebnisse mit Hilfe anderer molekularbiologischer Techniken schwerpunktmäßig zu evaluieren. Als mögliche Techniken sind dafür auf der Genexpressionsebene die quantitative "*real-time*" Polymerase-Kettenreaktion (*qrt*-PCR) und die *in situ*-Hybridisierung zu nennen. *In-situ*-Hybridisierungen ermöglichen es die veränderte Expression von Kandidatengenen spezifischen Zelltypen oder -populationen im HVC zuzuordnen. Versuche zur Verifikation durch Östradiol veränderter biologischer Prozesse könnten dann anhand derart ausgewählter Zelltypen durchgeführt werden.

Aus Versuchen zur Wirkung von Geschlechtshormonen auf das Gesangslernen lässt sich ableiten, dass Östrogen und Testosteron antagonistisch wirken. Die Veränderungen des HVC-Transkriptoms am Tag 50 nach siebentägiger Behandlung mit Östradiol bzw. DHT waren allerdings sehr ähnlich. Bemerkenswerterweise unterschied sich kein biologischer Prozess durch eine gegenläufige Expression. Diese Diskrepanz zwischen hier ermittelten Ergebnissen und den in weiteren Studien gefundenen verhaltensbiologischen Effekten könnte darauf zurückzuführen sein, dass Östradiol, wie auch die verwendeten Androgene sehr gewebe- und zellspezifisch die Genexpression beeinflussen. Aufgrund des multizellulären HVC-Gewebes könnte daher die zellspezifische Analyse weitere Hinweise geben.

Analysen der Entwicklungsstudie förderten unter anderem Gene zu Tage, die im HVC zum Teil stadienspezifisch deutlich gegenüber der adulten Kontrollgruppe überexprimiert waren. Die Charakterisierung und Isolation ihrer Promotoren könnte dazu beitragen, exogene Konstrukte stadienspezifisch im HVC zur Expression zu bringen. Darüber hinaus ermöglichen die Daten dieser Teilstudie eine Identifikation von Regulatoren, deren Expressionsmuster Parallelen zum Verlauf des Gesangslernens aufweisen. Folgestudien, bei denen HVC-Proben von Vögeln gewonnen werden, deren Gesangsverhalten aufgenommen wird, ließen sich dadurch selektiver analysieren. In weiteren Analysen ließen sich die Expressionsmuster von Regulatoren wie Transkriptionsfaktoren mit denen anderer Gene in Beziehung setzen, um potentielle Interaktionen zu entdecken.

6. Abkürzungsverzeichnis

Nachfolgend eine Auflistung aller verwendeten Abkürzungen. Auf die Nennung aller in der Arbeit verwendeten Gennamen (HUGO-Symbol) wird verzichtet.

1Tag-Ö ₂ -x	Versuchsgruppe des Alter x, welche für einen Tag mit Östradiol behandelt wurde
3β-HSD	3β-Hydroxystroid-Dehydrogenase
3'IVT	3' <i>In vitro</i> Transkription
5α-R	Steroid-5α-Reduktase 1
7Tage-DHT-50	Versuchsgruppe 50 Tage alter Zebrafinken, welche für sieben Tage mit Dihydrotestosteron behandelt wurde
7Tage-Ö ₂ -x	Versuchsgruppe des Alter x, welche für sieben Tage mit Östradiol behandelt wurde
7Tage-T-50	Versuchsgruppe 50 Tage alter Zebrafinken, welche für sieben Tage mit Testosteron behandelt wurde
12Tage-FAD-30	Versuchsgruppe 30 Tage alter Zebrafinken, welche für 12 Tage mit Fadrozol behandelt wurde
12Tage-Ö ₂ -30	Versuchsgruppe 30 Tage alter Zebrafinken, welche für 12 Tage mit Östradiol behandelt wurde
17β-HSD	17β-Hydroxystroid-Dehydrogenase
Abb.	Abbildung
AreaX	Area X striatalis medialis
AV	Nucleus avalanche
AVS	Anteriore Vorderhirnschleife
ca.	circa
cel-file	Datei, welche die Pixelintensitäten der Microarrays beinhaltet
cDNA	codierende Desoxyribonukleinsäure
Cy3 / Cy5	Fluoreszierende Cyaninfarbstoffe
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DLM	Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)NTP	Nukleosidtriphosphat
ENTW-X	Versuchsgruppe der Entwicklungsstudie des Alters x

FDR	False Discovery Rate
GePS	Genomatix Pathway System (Software zur Zuordnung von Gene zu spezifischen GO-Termini)
GO-Term	Gene Ontology Term
HUGO-Symbol	Gensymbol gemäß der Human Genome Organisation
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Kg	Kilogramm
Ico	Nucleus intercollicularis
IMAN	Nucleus lateralis magnocellularis nidopalii anterioris
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
mm	Millimeter
min.	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
mMAN	Nucleus medialis magnocellularis nidopalii anterioris
mRNA	Boten (RNA) Ribonukleinsäure
N	Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe
n	Anzahl der detektierten Gene bzw. biologischen Prozesse
nAM	Nucleus ambiguus
NCM	Nidopallium caudomediale
Nif	Nucleus interfascialis nidopallii
nRAM	Nucleus retroambiguus
nXlIts	Nucleus supraspinalis
Ov	Nucleus ovoidalis
P450arom	Aromatase (<i>CYP19A1</i>)
P450c17	Steroid-17α-Hydroxylase (<i>CYP17</i>)
pg	Pikogramm
PMB	Prämotorische Bahn
RA	Nucleus robustus arcopallii
RIA	Radioimmunoassay
R ²	Korrelationskoeffizient
SAM	Significance Analysis of Microarrays
Sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle

UVA	Nucleus uvaeformis
vgl.	vergleiche
%	Prozent
°C	Temperatur in Grad Celsius

7. Literaturverzeichnis

- Aamodt, S. M., Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (1995). Early isolation from conspecific song does not affect the normal developmental decline of N-methyl-D-aspartate receptor binding in an avian song nucleus. *Journal of neurobiology*, 27, 76–84.
- Absil, P., Balthazart, J., Ball, G. F., & Fiasse, V. (1994). Effects of the aromatase inhibitor R76713 on sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Behaviour*, 131(34), 225–60.
- Absil, P., Pinxten, R., Balthazart, J., & Eens, M. (2003). Effects of testosterone on Reelin expression in the brain of male European starlings. *Cell and tissue research*, 312(1), 81–93.
- Acharya, K. D., & Veney, S. L. (2011). Characterization of the G-protein coupled membrane bound estrogen receptor GPR30 in the zebra finch brain reveals a sex difference in gene and protein expression. *Developmental neurobiology*, 72(11), 1433–46.
- Acharya, K. D., & Veney, S. L. (2013). Sexually dimorphic expression and estradiol mediated up-regulation of a sex-linked ribosomal gene, RPS6, in the zebra finch brain. *Developmental neurobiology*, 73(8), 599–608.
- Adkins, E. K., & Adler, N. T. (1972). Hormonal control of behavior in the Japanese quail. *Journal of comparative and physiological psychology*, 81(1), 27–36.
- Adkins-Regan, E. (1999). Testosterone increases singing and aggression but not male-typical sexual partner preference in early estrogen treated female zebra finches. *Hormones and behavior*, 35(1), 63–70.
- Adkins-Regan, E., Abdelnabi, M., Mobarak, M., & Ottinger, M. A. (1990). Sex steroid levels in developing and adult male and female zebra finches (*Poephila guttata*). *General and comparative endocrinology*, 78(1), 93–109.
- Adkins-Regan, E., & Ascenzi, M. (1990). Sexual differentiation of behavior in the zebra finch: effect of early gonadectomy or androgen treatment. *Hormones and behavior*, 24(1), 114–27.
- Adkins-Regan, E., Mansukhani, V., Seiwert, C., & Thompson, R. (1994). Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *Journal of neurobiology*, 25(7), 865–77.
- Adret, P., & Margoliash, D. (2002). Metabolic and neural activity in the song system nucleus robustus archistriatalis: effect of age and gender. *The Journal of comparative neurology*, 454(4), 409–23.
- Agate, R. J., Choe, M., & Arnold, A. P. (2004). Sex differences in structure and expression of the sex chromosome genes CHD1Z and CHD1W in zebra finches. *Molecular biology and evolution*, 21(2), 384–96.
- Agate, R. J., Grisham, W., Wade, J., Mann, S., Wingfield, J., Schanen, C., ... Arnold, A. P. (2003). Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 100(8), 4873–8.
- Akutagawa, E., & Konishi, M. (1994). Two separate areas of the brain differentially guide the development of a song control nucleus in the zebra finch. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 91(26), 12413–7.

- Akutagawa, E., & Konishi, M. (2001). A monoclonal antibody specific to a song system nuclear antigen in estrildine finches. *Neuron*, 31(4), 545–56.
- Akutagawa, E., & Konishi, M. (2010). New brain pathways found in the vocal control system of a songbird. *The Journal of comparative neurology*, 518(15), 3086–100.
- Alvarez-Buylla, A., Kirn, J. R., & Nottebohm, F. (1990). Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. *Science*, 249(4975), 1444–6.
- Alward, B. A., Balthazart, J., & Ball, G. F. (2013). Differential effects of global versus local testosterone on singing behavior and its underlying neural substrate. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 110(48), 19573–8.
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2002). A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *The Journal of neuroscience*, 22(19), 8586–96.
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2002). Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *Journal of neuroendocrinology*, 14(11), 904–10.
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2004). Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nature neuroscience*, 7(6), 643–50.
- Andalman, A. S., & Fee, M. S. (2009). A basal ganglia-forebrain circuit in the songbird biases motor output to avoid vocal errors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 106(30), 12518–23.
- Andalman, A. S., Foerster, J. N., & Fee, M. S. (2011). Control of vocal and respiratory patterns in birdsong: Dissection of forebrain and brainstem mechanisms using temperature. *PLoS ONE*, 6(9), e25461.
- Andre, E., & Beckerandre, M. (1993). Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 190(1), 140–7.
- Apfelbeck, B., & Goymann, W. (2011). Ignoring the challenge? Male black redstarts (*Phoenicurus ochruros*) do not increase testosterone levels during territorial conflicts but they do so in response to gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 278(1722), 3233–42.
- Appeltants, D., Ball, G. F., & Balthazart, J. (2001). The distribution of tyrosine hydroxylase in the canary brain: demonstration of a specific and sexually dimorphic catecholaminergic innervation of the telencephalic song control nuclei. *Cell and tissue research*, 304, 237–59.
- Appeltants, D., Ball, G. F., & Balthazart, J. (2002). The origin of catecholaminergic inputs to the song control nucleus RA in canaries. *Neuroreport*, 13, 649–53.
- Appeltants, D., Ball, G. F., & Balthazart, J. (2003). Song activation by testosterone is associated with an increased catecholaminergic innervation of the song control system in female canaries. *Neuroscience*, 121(3), 801–14.
- Arevalo, M. A., Ruiz-Palmero, I., Scerbo, M. J., Acas-Fonseca, E., Cambiasso, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 131(1-2), 52–6.
- Arnold, A. P. (1975). The effects of castration on song development in zebra finches (*Poephila guttata*). *The Journal of experimental zoology*, 191(2), 261–78.
- Arnold, A. P. (1997). Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses, and a paradigm shift. *Journal of neurobiology*, 33(5), 572–84.

- Arnold, A. P., Wade, J., Grisham, W., Jacobs, E. C., & Campagnoni, A. T. (1996). Sexual differentiation of the brain in songbirds. *Developmental neuroscience*, 18(1-2), 124–36.
- Aronov, D., Andalman, A. S., & Fee, M. S. (2008). A specialized forebrain circuit for vocal babbling in the juvenile songbird. *Science*, 320(5876), 630-4.
- Baecker, T., Mangus, K., Pfaender, S., Chhabra, R., Boeckers, T. M., & Grabrucker, A. M. (2014). Loss of COMMD1 and copper overload disrupt zinc homeostasis and influence an autism-associated pathway at glutamatergic synapses. *Biometals*, 27(4), 715–30.
- Baker, M. E. (2003). Evolution of adrenal and sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity. *BioEssays*, 25(4), 396–400.
- Balthazart, J., Foidart, A., Wilson, E. M., & Ball, G. F. (1992). Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain. *The Journal of comparative neurology*, 317(4), 407–20.
- Barami, K., Kirschenbaum, B., Lemmon, V., & Goldman, S. A. (1994). N-Cadherin and Ng-CAM/8D9 are involved serially in the migration of newly generated neurons into the adult songbird brain. *Neuron*, 13(3), 567–82.
- Barria, A. (2007). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. In *Protein Trafficking in Neurons*, Elsevier, 203–21.
- Bartuzi, P., Hofker, M. H., & van de Sluis, B. (2013). Tuning NF- κ B activity: a touch of COMMD proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), 2315–21.
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H., & Pech, M. (1994). PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of cell biology*, 125(4), 917–28.
- Bauer, E. E., Coleman, M. J., Roberts, T. F., Roy, A., Prather, J. F., & Mooney, R. (2008). A synaptic basis for auditory-vocal integration in the songbird. *The Journal of neuroscience*, 28(6), 1509–22.
- Baulieu, E. E., Robel, P., & Schumacher, M. (2001). Neurosteroids: beginning of the story. *International review of neurobiology*, 46, 1–32.
- Baum, M. J., Carroll, R. S., Cherry, J. A., & Tobet, S. A. (1990). Steroidal control of behavioural, neuroendocrine and brain sexual differentiation: studies in a carnivore, the ferret. *Journal of neuroendocrinology*, 2(4), 401–18.
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63, 182–217.
- Bender, A. T., & Veney, S. L. (2008). Treatment with the specific estrogen receptor antagonist ICI 182,780 demasculinizes neuron soma size in the developing zebra finch brain, *Brain research*, 1246, 47–53.
- Bernard, D. J., Bentley, G. E., Balthazart, J., Turek, F. W., & Ball, G. F. (1999). Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology*, 140(10), 4633–43.
- Bernard-Trifilo, J. A., Kramár, E. A., Torp, R., Lin, C.-Y., Pineda, E. A., Lynch, G., & Gall, C. M. (2005). Integrin signaling cascades are operational in adult hippocampal synapses and modulate NMDA receptor physiology. *Journal of neurochemistry*, 93(4), 834–49.
- Bertrand, D., Elmslie, F., Hughes, E., Trounce, J., Sander, T., Bertrand, S., & Steinlein, O. K. (2005). The CHRNA2 mutation I312M is associated with epilepsy and distinct memory deficits. *Neurobiology of disease*, 20(3), 799–804.

- Birkhead, T. R., Pellatt, J., & Hunter, F. M. (1988). Extra-pair copulation and sperm competition in the zebra finch. *Nature*, 334(6177), 60–2.
- Bischof, H.-J., Geissler, E., Rollenhagen, A., & Geißler, E. (2002). Limitations of the sensitive period for sexual imprinting: neuroanatomical and behavioral experiments in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Behavioural brain research*, 133(2), 317–22.
- Boelens, M. C., te Meerman, G. J., Gibcus, J. H., Blokzijl, T., Boezen, H. M., Timens, W., ... van den Berg, A. (2007). Microarray amplification bias: loss of 30% differentially expressed genes due to long probe - poly(A)-tail distances. *BMC genomics*, 8(1), 277.
- Boettiger, C. A., & Doupe, A. J. (2001). Developmentally restricted synaptic plasticity in a songbird nucleus required for song learning. *Neuron*, 31(5), 809–18.
- Böhner, J. (1990). Early acquisition of song in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Animal behaviour*, 39(2), 369–74.
- Bolhuis, J. J., & Gahr, M. (2006). Neural mechanisms of birdsong memory. *Nature reviews neuroscience*, 7(5), 347–57.
- Bottjer, S. W. (1993). The distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brains of male and female zebra finches. *Journal of neurobiology*, 24(1), 51–69.
- Bottjer, S. W., & Altenau, B. (2010). Parallel pathways for vocal learning in basal ganglia of songbirds. *Nature neuroscience*, 13(2), 153–5.
- Bottjer, S. W., Glaessner, S. L., & Arnold, A. P. (1985). Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. *The Journal of neuroscience*, 5(6), 1556–62.
- Bottjer, S. W., & Hewer, S. J. (1992). Castration and antisteroid treatment impair vocal learning in male zebra finches. *Journal of neurobiology*, 23(4), 337–353.
- Bottjer, S. W., & Johnson, F. (1997). Circuits, hormones, and learning: vocal behavior in songbirds. *Journal of neurobiology*, 33(5), 602–18.
- Bottjer, S. W., Miesner, E. A., & Arnold, A. P. (1984). Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. *Science*, 224(4651), 901–3.
- Bottjer, S. W., Roselinsky, H., & Tran, N. B. (1997). Sex differences in neuropeptide staining of song-control nuclei in zebra finch brains. *Brain, behavior and evolution*, 50(5), 284–303.
- Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M., & Pasquale, E. B. (2007). The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *The Journal of cell biology*, 178(7), 1295–307.
- Bourguet, W., Germain, P., & Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences*, 21(10), 381–8.
- Brainard, M. S., & Doupe, A. J. (2000). Auditory feedback in learning and maintenance of vocal behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 1(1), 31–40.
- Brigidi, G. S., & Bamji, S. X. (2011). Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 208–14.

- Brown, S. D., Johnson, F., & Bottjer, S. W. (1993). Neurogenesis in adult canary telencephalon is independent of gonadal hormone levels. *The Journal of neuroscience*, 13(5), 2024–32.
- Bunse, S., Garg, S., Junek, S., Vogel, D., Ansari, N., Stelzer, E. H. K., & Schuman, E. (2013). Role of N-cadherin cis and trans interfaces in the dynamics of adherens junctions in living cells. *PloS one*, 8(12), e81517.
- Burek, M. J., Nordeen, K. W., & Nordeen, E. J. (1995). Estrogen promotes neuron addition to an avian song-control nucleus by regulating post-mitotic events. *Brain research. Developmental brain research*, 85(2), 220–4.
- Butler, A. B., Reiner, A., & Karten, H. J. (2011). Evolution of the amniote pallium and the origins of mammalian neocortex. *Annals of the New York academy of sciences*, 1225, 14–27.
- Cardin, J. A., & Schmidt, M. F. (2004). Noradrenergic inputs mediate state dependence of auditory responses in the avian song system. *The Journal of neuroscience*, 24(35), 7745–53.
- Carraway, K. L., Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., & Lai, C. (1997). Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 387(6632), 512–6.
- Carrer, H. F., & Cambiasso, M. J. (2002). Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cellular and molecular neurobiology*, 22(5-6), 479–500.
- Catchpole, C. K., & Slater, P. J. B. (2003). *Bird Song: Biological Themes and Variations*, Cambridge University Press.
- Cavarretta, I. T. R., Mukopadhyay, R., Lonard, D. M., Cowser, L. M., Bennett, C. F., O'Malley, B. W., & Smith, C. L. (2002). Reduction of coactivator expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits ERalpha transcriptional activity and MCF-7 proliferation. *Molecular endocrinology*, 16(2), 253–70.
- Chao, A., Paon, A., & Remage-Healey, L. (2014). Dynamic variation in forebrain estradiol levels during song learning. *Developmental neurobiology*, DOI: 10.1002/dneu.22228.
- Chen, J. R., Stepanek, L., & Doupe, A. J. (2014). Differential contributions of basal ganglia and thalamus to song initiation, tempo, and structure. *Journal of neurophysiology*, 111(2), 248-57.
- Chen, X., Agate, R. J., Itoh, Y., & Arnold, A. P. (2005). Sexually dimorphic expression of trkB, a Z-linked gene, in early posthatch zebra finch brain. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 102(21), 7730–5.
- Chen, Z., Ye, R., & Goldman, S. A. (2013). Testosterone modulation of angiogenesis and neurogenesis in the adult songbird brain. *Neuroscience*, 239(139-48).
- Cho, Y.-W., Yi, S.-D., Lim, J.-G., Kim, D.-K., & Motamedi, G. K. (2008). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mild memory impairment associated with CHRNA2 mutation I312M in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Epilepsy & behavior*, 13(2), 361–5.
- Clayton, N. S. (1988). Song discrimination learning in zebra finches. *Animal behaviour*, 36(4), 1016–24.
- Clegg, D. O. (2000). Novel roles for integrins in the nervous system. *Molecular cell biology research communications*, 3(1), 1–7.
- Coleman, M. J., & Mooney, R. (2004). Synaptic transformations underlying highly selective auditory representations of learned birdsong. *The Journal of neuroscience*, 24(33), 7251–65.

- Collinson, N., Kuenzi, F. M., Jarolimek, W., Maubach, K. A., Cothliff, R., Sur, C., ... Rosahl, T. W. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience*, 22(13), 5572–80.
- Cousins, S. L., Innocent, N., & Stephenson, F. A. (2013). Neto1 associates with the NMDA receptor/amyloid precursor protein complex. *Journal of neurochemistry*, 126(5), 554–64.
- Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., & Parker, M. G. (1997). Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *The Journal of biological chemistry*, 272(32), 19858–62.
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J.-M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., ... Rudolph, U. (2002). Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 99(13), 8980–5.
- Cui, Z., Feng, R., Jacobs, S., Duan, Y., Wang, H., Cao, X., & Tsien, J. Z. (2013). Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Scientific reports*, 3, 1036.
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004, re16.
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in molecular neuroscience*, 3, 1.
- Cynx, J., & Nottebohm, F. (1992). Role of gender, season, and familiarity in discrimination of conspecific song by zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 89(4), 1368–71.
- Daisley, J. N., Gruss, M., Rose, S. P. R., & Braun, K. (1998). Passive avoidance training and recall are associated with increased glutamate levels in the intermediate medial hyperstriatum ventrale of the day-old chick. In *Neural plasticity* 6(3), 53–61.
- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277), 718–21.
- Dave, A. S., Yu, A. C., & Margoliash, D. (1998). Behavioral state modulation of auditory activity in a vocal motor system. *Science*, 282(5397), 2250–4.
- Davis, E. C., Popper, P., & Gorski, R. A. (1996). The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain research*, 734, 10–18.
- Daw, N. W., Reid, S. N., & Beaver, C. J. (1999). Development and function of metabotropic glutamate receptors in cat visual cortex. *Journal of neurobiology*, 41(1), 102–7.
- De Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics*, 20 (9), 1453–4.
- De Monasterio-Schrader, P., Jahn, O., Tenzer, S., Wichert, S. P., Patzig, J., & Werner, H. B. (2012). Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cellular and molecular life sciences*, 69(17), 2879–94.
- Del Negro, C., & Edeline, J.-M. (2001). Differences in auditory and physiological properties of HVC neurons between reproductively active male and female canaries (*Serinus canaria*). *The European journal of neuroscience*, 14(8), 1377–89.
- Del Negro, C., Gahr, M., Leboucher, G., & Kreutzer, M. (1998). The selectivity of sexual responses to song displays: effects of partial chemical lesion of the HVC in female canaries. *Behavioural brain research*, 96(1-2), 151–9.

- Derégnaucourt, S., & Gahr, M. (2013). Horizontal transmission of the father's song in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Biology letters*, 9(4), 20130247.
- Derégnaucourt, S., Mitra, P. P., Fehér, O., Pytte, C., & Tchernichovski, O. (2005). How sleep affects the developmental learning of bird song. *Nature*, 433, 710–6.
- DeVoogd, T., & Nottebohm, F. (1981). Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science*, 214(4517), 202–4.
- Dittrich, F., Feng, Y., Metzdorf, R., & Gahr, M. (1999). Estrogen-inducible, sex-specific expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in a forebrain song control nucleus of the juvenile zebra finch. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 96(14), 8241–6.
- Dittrich, F., Ter Maat, A., Jansen, R. F., Pieneman, A., Hertel, M., Frankl-Vilches, C., & Gahr, M. (2013). Maximized song learning of juvenile male zebra finches following BDNF expression in the HVC. *The European journal of neuroscience*, 38(9), 3338–44.
- Döhler, K. D., Coquelin, A., Davis, F., Hines, M., Shryne, J. E., & Gorski, R. A. (1984). Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain research*, 302, 291–5.
- Drnevich, J., Replogle, K. L., Lovell, P., Hahn, T. P., Johnson, F., Mast, T. G., ... Clayton, D. F. (2012). Impact of experience-dependent and -independent factors on gene expression in songbird brain. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 109 Suppl, 17245–52.
- Duncan, K. A., & Carruth, L. L. (2011). The song remains the same: coactivators and sex differences in the songbird brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 32(1), 84–94.
- Duncan, K. A., Carruth, L. L., & Kelli A. Duncan, L. L. C. (2007). The sexually dimorphic expression of L7/SPA, an estrogen receptor coactivator, in zebra finch telencephalon. *Developmental Neurobiology*, 67(14), 1852–66.
- Duncan, K. A., Jimenez, P., & Carruth, L. L. (2009). The selective estrogen receptor-alpha coactivator, RPL7, and sexual differentiation of the songbird brain. *Psychoneuroendocrinology*, 34(Suppl. 1), S30-8.
- Duncan, K. A., Jimenez, P., & Carruth, L. L. (2010). Distribution and sexually dimorphic expression of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in the zebra finch brain. *General and comparative endocrinology*, 170(2), 408–14.
- Duncan, K. A., Walters, B. J., & Saldanha, C. J. (2013). Traumatized and inflamed--but resilient: glial aromatization and the avian brain. *Hormones and behavior*, 63(2), 208–15.
- Dutar, P., Petrozzino, J. J., Vu, H. M., Schmidt, M. F., & Perkel, D. J. (2000). Slow synaptic inhibition mediated by metabotropic glutamate receptor activation of GIRK channels. *Journal of neurophysiology*, 84(5), 2284–90.
- Dutar, P., Vu, H. M., & Perkel, D. J. (1998). Multiple cell types distinguished by physiological, pharmacological, and anatomic properties in nucleus HVC of the adult zebra finch. *Journal of neurophysiology*, 80(4), 1828–38.
- Eales, L. A. (1985). Song learning in zebra finches: some effects of song model availability on what is learnt and when. *Animal behaviour*, 33(4), 1293–1300.
- Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., ... Coleman, P. (1992). Analysis of gene expression in single live neurons. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 89(7), 3010–4.
- Eens, M. (1997). Understanding the complex song of the European starling: an integrated ethological approach. *Advances in the study of behavior*, 26, 355 – 434.

- Elemans, C. P. H., Mead, A. F., Rome, L. C., & Goller, F. (2008). Superfast vocal muscles control song production in songbirds. *PLoS ONE*, 3(7), e2581.
- Elvander-Tottie, E., Eriksson, T. M., Sandin, J., & Ogren, S. O. (2009). 5-HT(1A) and NMDA receptors interact in the rat medial septum and modulate hippocampal-dependent spatial learning. *Hippocampus*, 19(12), 1187–98.
- Eriksson, T. M., Madjid, N., Elvander-Tottie, E., Stiedl, O., Svenningsson, P., & Ogren, S. O. (2008). Blockade of 5-HT 1B receptors facilitates contextual aversive learning in mice by disinhibition of cholinergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropharmacology*, 54(7), 1041–50.
- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., ... Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 94(13), 6803–8.
- Farries, M. A. (2004). The avian song system in comparative perspective. *Annals of the New York academy of sciences*, 1016, 61–76.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., & Bland, K. I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology*, 16(1), 70–84.
- Filice, E., Recchia, A. G., Pellegrino, D., Angelone, T., Maggiolini, M., & Cerra, M. C. (2009). A new membrane G-protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat. *Journal of physiology and pharmacology*, 60(4), 3–10.
- Fortune, E. S., & Margoliash, D. (1995). Parallel pathways and convergence onto HVc and adjacent neostriatum of adult zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *The Journal of comparative neurology*, 360(3), 413–41.
- Foster, E. F., & Bottjer, S. W. (1998). Axonal connections of the high vocal center and surrounding cortical regions in juvenile and adult male zebra finches. *The Journal of comparative neurology*, 397(1), 118–38.
- Foster, E. F., Mehta, R. P., & Bottjer, S. W. (1997). Axonal connections of the medial magnocellular nucleus of the anterior neostriatum in zebra finches. *The Journal of comparative neurology*, 382(3), 364–81.
- Fox, K., Henley, J., & Isaac, J. (1999). Experience-dependent development of NMDA receptor transmission. *Nature neuroscience*, 2(4), 297–9.
- Frankl-Vilches, C. et al. 2015. Using the canary genome to decipher the evolution of hormone-sensitive gene regulation in seasonal singing birds, *Genome biology* 16, 19.
- Franz, M., & Goller, F. (2003). Respiratory patterns and oxygen consumption in singing zebra finches. *The Journal of experimental biology*, 206(6), 967–78.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185–92.
- Fusani, L., & Gahr, M. (2006). Hormonal influence on song structure and organization: the role of estrogen. *Neuroscience*, 138(3), 939–46.
- Gahr, M. (1988). Bedeutung von östrogensensitiven Zellen für die Morphogenese gesangskontrollierender Gehirnzentren des Kanarienvogels (*Serinus canaria*) und des Zebrafinken (*Poephila guttata*). Dissertation. Universität Kaiserslautern.
- Gahr, M. (1990). Localization of androgen receptors and estrogen receptors in the same cells of the songbird brain. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 87(23), 9445–8.

- Gahr, M. (1996). Developmental changes in the distribution of oestrogen receptor mRNA expressing cells in the forebrain of female, male and masculinized female zebra finches. *Neuroreport*, 7(15-17), 2469–73.
- Gahr, M. (1997). How should brain nuclei be delineated ? *Trends in neurosciences*, 20, 58–62.
- Gahr, M. (2000). Neural song control system of hummingbirds: comparison to swifts, vocal learning (Songbirds) and nonlearning (Suboscines) passerines, and vocal learning (Budgerigars) and nonlearning (Dove, owl, gull, quail, chicken) nonpasserines. *The Journal of comparative neurology*, 426(2), 182–96.
- Gahr, M. (2003). Male Japanese quails with female brains do not show male sexual behaviors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 100(13), 7959–64.
- Gahr, M. (2004). Hormone-dependent neural plasticity in the juvenile and adult song system: what makes a successful male? *Annals of the New York academy of sciences*, 1016(1), 684–703.
- Gahr, M. (2007). Sexual differentiation of the vocal control system of birds. *Advances in genetics*, 59, 67–105.
- Gahr, M., Flügge, G., & Güttinger, H. R. (1987). Immunocytochemical localization of estrogen-binding neurons in the songbird brain. *Brain research*, 402(1), 173–7.
- Gahr, M., Güttinger, H. R., & Kroodsmas, D. E. (1993). Estrogen receptors in the avian brain: survey reveals general distribution and forebrain areas unique to songbirds. *The Journal of comparative neurology*, 327(1), 112–22.
- Gahr, M., & Konishi, M. (1988). Developmental changes in estrogen-sensitive neurons in the forebrain of the zebra finch. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 85(19), 7380–3.
- Gahr, M., & Metzdorf, R. (1997). Distribution and dynamics in the expression of androgen and estrogen receptors in vocal control systems of songbirds. *Brain research bulletin*, 44(4), 509–17.
- Gahr, M., & Metzdorf, R. (1999). The sexually dimorphic expression of androgen receptors in the song nucleus hyperstriatalis ventrale pars caudale of the zebra finch develops independently of gonadal steroids. *Journal of Neuroscience*, 19(7), 2628–36.
- Gahr, M., Metzdorf, R., & Aschenbrenner, S. (1996). The ontogeny of the canary HVC revealed by the expression of androgen and oestrogen receptors. *Neuroreport*, 8(1), 311–5.
- Gaiarsa, J.-L., & Porcher, C. (2013). Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 206.
- Gampe, R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., ... Xu, H. E. (2000). Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Molecular cell*, 5(3), 545–55.
- Gao, H., & Dahlman-Wright, K. (2011). The gene regulatory networks controlled by estrogens. *Molecular and cellular endocrinology*, 334(1-2), 83–90.
- Gassmann, M., & Bettler, B. (2012). Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(6), 380–94.
- Gerfen, C. R. (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends in neurosciences*, 23(10), S64–70.
- Gill, F & D Donsker (Eds). 2014. IOC World Bird List (v 4.4). doi: 10.14344/IOC.ML.4.4.

- Goodman, C. S., & Shatz, C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72, 77–98.
- Gooley, J. J., Lu, J., Fischer, D., & Saper, C. B. (2003). A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *The Journal of neuroscience*, 23(18), 7093–106.
- Gorski, R. A., Harlan, R. E., Jacobson, C. D., Shryne, J. E., & Southam, A. M. (1980). Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 193, 529–39.
- Goymann, W., Geue, D., Schwabl, I., Flinks, H., Schmidl, D., Schwabl, H., & Gwinner, E. (2006). Testosterone and corticosterone during the breeding cycle of equatorial and European stonechats (*Saxicola torquata axillaris* and *S. t. rubicola*). *Hormones and behavior*, 50(5), 779–85.
- Goymann, W., Trappschuh, M., & Fusani, L. (2008). A gentler method to raise melatonin levels in birds. *Journal of biological rhythms*, 23(3), 274–7.
- Grasberger, H., & Refetoff, S. (2006). Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *The Journal of biological chemistry*, 281(27), 18269–72.
- Grisham, W., & Arnold, A. P. (1994). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the song system of the zebra finch. *Brain research*, 651(1-2), 115–22.
- Grisham, W., & Arnold, A. P. (1995). A direct comparison of the masculinizing effects of testosterone, androstenedione, estrogen, and progesterone on the development of the zebra finch song system. *Journal of neurobiology*, 26(2), 163–70.
- Grisham, W., Park, S. H., Hsia, J. K., Kim, C., Leung, M. C., Kim, L., & Arnold, A. P. (2007). Effects of long-term flutamide treatment during development in zebra finches. *Neuroscience letters*, 418(1), 92–6.
- Gros, R., Ding, Q., Sklar, L. A., Prossnitz, E. E., Arterburn, J. B., Chorazyczewski, J., & Feldman, R. D. (2011). GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*, 57(3), 442–51.
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., ... Keshet, E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 124(1), 175–89.
- Gurney, M. E. (1981). Hormonal control of cell form and number in the zebra finch song system. *The Journal of neuroscience*, 1(6), 658–73.
- Gurney, M. E. (1982). Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system. *Brain research*, 231(1), 153–72.
- Gurney, M. E., & Konishi, M. (1980). Hormone-induced sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science*, 208(4450), 1380–3.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., ... Yuri, T. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320(5884), 1763–8.
- Hahnloser, R. H. R., & Kotowicz, A. (2010). Auditory representations and memory in birdsong learning. *Current opinion in neurobiology*, 20(3), 332–9.
- Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., & Fee, M. S. (2002). An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, 419(6902), 65–70.

- Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), 36869–72.
- Hall, J. M., & McDonnell, D. P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, 140(12), 5566–78.
- Harding, C. F., Barclay, S. R., & Waterman, S. A. (1998). Changes in catecholamine levels and turnover rates in hypothalamic, vocal control, and auditory nuclei in male zebra finches during development. *Journal of neurobiology*, 34(4), 329–46.
- Harding, C. F., Sheridan, K., & Walters, M. J. (1983). Hormonal specificity and activation of sexual behavior in male zebra finches. *Hormones and behavior*, 17(1), 111–33.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., ... White, R. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D258–61.
- Hartog, T. E., Dittrich, F., Pieneman, A. W., Jansen, R. F., Frankl-Vilches, C., Lessmann, V., ... Gahr, M. (2009). Brain-derived neurotrophic factor signaling in the HVC is required for testosterone-induced song of female canaries. *The Journal of neuroscience*, 29(49), 15511–9.
- Harvey, J. A. (2003). Role of the serotonin 5-HT(2A) receptor in learning. *Learning & memory*, 10(5), 355–62.
- Heasman, S. J., & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9), 690–701.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory*, John Wiley & Sons, Inc.
- Heimovics, S. A., Prior, N. H., Maddison, C. J., & Soma, K. K. (2012). Rapid and widespread effects of 17 β -estradiol on intracellular signaling in the male songbird brain: a seasonal comparison. *Endocrinology*, 153(3), 1364–76.
- Heinrich, J. E., Singh, T. D., Nordeen, K. W., & Nordeen, E. J. (2003). NR2B downregulation in a forebrain region required for avian vocal learning is not sufficient to close the sensitive period for song learning. *Neurobiology of learning and memory*, 79, 99–108.
- Heinrich, J. E., Singh, T. D., Sohrabji, F., Nordeen, K. W., & Nordeen, E. J. (2002). Developmental and hormonal regulation of NR2A mRNA in forebrain regions controlling avian vocal learning. *Journal of neurobiology*, 51(2), 149–59.
- Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental neurology*, 190 Suppl, S8–21.
- Herrmann, K., & Arnold, A. P. (1991). Lesions of HVc block the developmental masculinizing effects of estradiol in the female zebra finch song system. *Journal of neurobiology*, 22(1), 29–39.
- Herrmann, K., & Bischof, H. J. (1986). Delayed development of song control nuclei in the zebra finch is related to behavioral development. *The Journal of comparative neurology*, 245(2), 167–75.
- Hessler, N. A., & Doupe, A. J. (1999). Social context modulates singing-related neural activity in the songbird forebrain. *Nature neuroscience*, 2(3), 209–11.
- Hill, W. L., Ballard, S., Coyer, M. J., & Rowley, T. (2005). The interaction of testosterone and breeding phase on the reproductive behavior and use of space of male zebra finches. *Hormones and behavior*, 47(4), 452–8.

- Hojo, Y., Higo, S., Ishii, H., Ooishi, Y., Mukai, H., Murakami, G., ... Kawato, S. (2009). Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology*, 150(11), 5106–12.
- Holloway, C. C., & Clayton, D. F. (2001). Estrogen synthesis in the male brain triggers development of the avian song control pathway in vitro. *Nature neuroscience*, 4(2), 170–5.
- Hsiao, P. W., Lin, D. L., Nakao, R., & Chang, C. (1999). The linkage of Kennedy's neuron disease to ARA24, the first identified androgen receptor polyglutamine region-associated coactivator. *The Journal of biological chemistry*, 274(29), 20229–34.
- Hsu, H.-K., Shao, P.-L., Tsai, K.-L., Shih, H.-C., Lee, T.-Y., & Hsu, C. (2005). Gene regulation by NMDA receptor activation in the SDN-POA neurons of male rats during sexual development. *Journal of molecular endocrinology*, 34(2), 433–45.
- Hughes, D. E., & Boyce, B. F. (1998). Estrogen, transforming growth factor-beta, and the regulation of bone metabolism in health and disease. *The Endocrinologist*, 8(2), 55–61.
- Hutchison, J. B., Wingfield, J. C., & Hutchison, R. E. (1984). Sex differences in plasma concentrations of steroids during the sensitive period for brain differentiation in the zebra finch. *Journal of endocrinology*, 103(3), 363–9.
- Immelmann. (1962). Beiträge zu einer vergleichenden Biologie australischer Prachtfinken (Spermestidae). *Zoologisches Jahrbuch für Systematik*, 90, 1–196.
- Immelmann. (1969). Song development in the zebra finch and other estrildid finches. Hinde RA (ed) *Bird vocalisation: Their relation to current problems in biology and psychology*. Cambridge University Press, Cambridge, 61–74.
- Inagaki, M., Aoyama, M., Sobue, K., Yamamoto, N., Morishima, T., Moriyama, A., ... Asai, K. (2004). Sensitive immunoassays for human and rat GMFB and GMFG, tissue distribution and age-related changes. *Biochimica et biophysica acta*, 1670(3), 208–16.
- Indra, I., Hong, S., Troyanovsky, R., Kormos, B., & Troyanovsky, S. (2013). The adherens junction: a mosaic of cadherin and nectin clusters bundled by actin filaments. *The Journal of investigative dermatology*, 133(11), 2546–54.
- Jacobs, E. C., Arnold, A. P., & Campagnoni, A. T. (1996). Zebra finch estrogen receptor cDNA: cloning and mRNA expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 59(2), 135–45.
- Jacobs, E. C., Arnold, A. P., & Campagnoni, A. T. (1999). Developmental regulation of the distribution of aromatase- and estrogen-receptor- mRNA-expressing cells in the zebra finch brain. *Developmental neuroscience*, 21(6), 453–72.
- Jacobs, E. C., Grisham, W., & Arnold, A. P. (1995). Lack of a synergistic effect between estradiol and dihydrotestosterone in the masculinization of the zebra finch song system. *Journal of neurobiology*, 27(4), 513–9.
- Jakob, R., Beutner, G., Sharma, V. K., Duan, Y., Gross, R. A., Hurst, S., ... Sheu, S.-S. (2014). Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons. *Neuroscience letters*, 575, 7–12.
- Jarvis, E. D. (1997). Motor-driven gene expression. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 94(8), 4097–102.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., ... Zhang, G. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346(6215), 1320–31.

- Jarvis, E. D., Ribeiro, S., da Silva, M. L., Ventura, D., Vielliard, J., & Mello, C. V. (2000). Behaviourally driven gene expression reveals song nuclei in hummingbird brain. *Nature*, 406(6796), 628–32.
- Jensen, E. V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspectives in biology and medicine*, 6, 47–59.
- Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W., & DeSombre, E. R. (1968). A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 59(2), 632–8.
- Jeong, J. K., Burrows, K., Tremere, L. A., & Pinaud, R. (2011). Neurochemical organization and experience-dependent activation of estrogen-associated circuits in the songbird auditory forebrain. *The European journal of neuroscience*, 34(2), 283–91.
- Johnson, F., Sablan, M. M., & Bottjer, S. W. (1995). Topographic organization of a forebrain pathway involved with vocal learning in zebra finches. *The Journal of comparative neurology*, 358(2), 260–78.
- Jones, A. E., ten Cate, C., & Slater, P. J. B. (1996). Early experience and plasticity of song in adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Journal of comparative psychology*, 110(4), 354–69.
- Karki, P., Smith, K., Johnson, J., & Lee, E. (2014). Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: role of transforming growth factor- α in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. *Molecular and cellular endocrinology*, 389(1-2), 58–64.
- Kato, M., & Okanoya, K. (2010). Molecular characterization of the song control nucleus HVC in Bengalese finch brain. *Brain research*, 1360, 56–76.
- Katz, A., Mirzaton, A., Zhen, Y., & Schlenger, B. A. (2008). Sex differences in cell proliferation and glucocorticoid responsiveness in the zebra finch brain. *The European journal of neuroscience*, 28(1), 99–106.
- Katz, L. C., & Gurney, M. E. (1981). Auditory responses in the zebra finch's motor system for song. *Brain research*, 221(1), 192–7.
- Kelley, D. B., & Nottebohm, F. (1979). Projections of a telencephalic auditory nucleus-field L-in the canary. *The Journal of comparative neurology*, 183, 455–69.
- Khurshid, N., Agarwal, V., & Iyengar, S. (2009). Expression of mu- and delta-opioid receptors in song control regions of adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Journal of chemical neuroanatomy*, 37(3), 158–69.
- Kidd, F. L., Coumis, U., Collingridge, G. L., Crabtree, J. W., & Isaac, J. T. R. (2002). A presynaptic kainate receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. *Neuron*, 34, 635–46.
- Kidd, F. L., & Isaac, J. T. (1999). Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature*, 400(6744), 569–73.
- Kilb, W. (2012). Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *The Neuroscientist*, 18(6), 613–30.
- Kim, Y. H., Perlman, W. R., & Arnold, A. P. (2004). Expression of androgen receptor mRNA in zebra finch song system: developmental regulation by estrogen. *The Journal of comparative neurology*, 469(4), 535–47.
- Kim, Y.-H., Peregrine, J., & Arnold, A. P. (2006). The distribution of expression of doublecortin (DCX) mRNA and protein in the zebra finch brain. *Brain research*, 1106, 189–96.

- Kirn, J. R., & DeVoogd, T. J. (1989). Genesis and death of vocal control neurons during sexual differentiation in the zebra finch. *The Journal of neuroscience*, 9(9), 3176–87.
- Kittelberger, J. M., & Mooney, R. (1999). Lesions of an avian forebrain nucleus that disrupt song development alter synaptic connectivity and transmission in the vocal premotor pathway. *The Journal of neuroscience*, 19(21), 9385–98.
- Knoblauch, R., & Garabedian, M. J. (1999). Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3748–59.
- Kobayashi, K., Uno, H., & Okanoya, K. (2001). Partial lesions in the anterior forebrain pathway affect song production in adult Bengalese finches. *Neuroreport*, 12(2), 353–8.
- Kolvenbag, G., Furr, B., & Blackledge, G. (1998). Receptor affinity and potency of non-steroidal antiandrogens: translation of preclinical findings into clinical activity. *Postate cancer and prostatic diseases*, 1(6), 307–14.
- Konishi. (1965). The role of auditory feedback in the control of vocalization in the White-crowned sparrow. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 22(7), 770–83.
- Konishi, M. (1965). Effects of deafening on song development in American robins and black-headed grosbeaks. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 22(5), 584–99.
- Konishi, M., & Akutagawa, E. (1985). Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. *Nature*, 315(6015), 145–7.
- Konishi, M., & Akutagawa, E. (1987). Hormonal control of cell death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch. *Ciba Foundation symposium*, 126, 173–85.
- Konishi, M., & Akutagawa, E. (1990). Growth and atrophy of neurons labeled at their birth in a song nucleus of the zebra finch. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 87(9), 3538–41.
- Konishi, M., & Gurney, M. E. (1982). Sexual differentiation of brain and behaviour. *Trends in neurosciences*, 5, 20–3.
- Korsia, S., & Bottjer, S. W. (1991). Chronic testosterone treatment impairs vocal learning in male zebra finches during a restricted period of development, *The Journal of neuroscience*, 11(8), 2362–71.
- Kranz, G. S., Kasper, S., & Lanzenberger, R. (2010). Reward and the serotonergic system. *Neuroscience*, 166(4), 1023–35.
- Kröger, S., & Mann, S. (1996). Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *The European journal of neuroscience*, 8(3), 500–9.
- Kröger, S., & Schröder, J. E. (2002). Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. *News in physiological sciences*, 17, 207–12.
- Kruger, R. P., Aurandt, J., & Guan, K.-L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(10), 789–800.
- Kubikova, L., Wada, K., & Jarvis, E. D. (2010). Dopamine receptors in a songbird brain. *The Journal of comparative neurology*, 518(6), 741–69.
- Kubota, M., & Taniguchi, I. (1998). Electrophysiological characteristics of classes of neuron in the HVC of the Zebra finch. *Journal of neurophysiology*, 80(2), 914–23.

- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 93(12), 5925–30.
- Kumar, C. C. (1998). Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, 17(11 Reviews), 1365–73.
- Lange, S., Heger, J., Euler, G., Wartenberg, M., Piper, H. M., & Sauer, H. (2009). Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, 81(1), 159–68.
- Langer, G., Bader, B., Meoli, L., Isensee, J., Delbeck, M., Noppinger, P. R., & Otto, C. (2010). A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*, 75(8-9), 603–10.
- Lappano, R., De Marco, P., De Francesco, E. M., Chimento, A., Pezzi, V., & Maggiolini, M. (2013). Cross-talk between GPER and growth factor signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 137, 50–6.
- Lauay, C., Gerlach, N. M., Adkins-Regan, E., & DeVoogd, T. J. (2004). Female zebra finches require early song exposure to prefer high-quality song as adults. *Animal behaviour*, 68(6), 1249–55.
- Lauay, C., Komorowski, R. W., Beaudin, A. E., & DeVoogd, T. J. (2005). Adult female and male zebra finches show distinct patterns of spine deficits in an auditory area and in the song system when reared without exposure to normal adult song. *The Journal of comparative neurology*, 487(2), 119–26.
- Lauri, S. E., Vesikansa, A., Segerstråle, M., Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R., & Taira, T. (2006). Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron*, 50(3), 415–29.
- Lee, C., Zhang, F., Tang, Z., Liu, Y., & Li, X. (2013). PDGF-C: a new performer in the neurovascular interplay. *Trends in molecular medicine*, 19(8), 474–86.
- Lelandais, G., & Le Crom, S. (2007). *Introduction to Systems Biology*. (S. Choi, Ed.) (pp. 147–59). Totowa, NJ: Humana Press.
- Lenz, K. M., Nugent, B. M., & McCarthy, M. M. (2012). Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Frontiers in neuroscience*, 6, 26.
- Leonardo, A. (2004). Experimental test of the birdsong error-correction model. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 101(48), 16935–40.
- Leonardo, A., & Konishi, M. (1999). Decrystallization of adult birdsong by perturbation of auditory feedback. *Nature*, 399(6735), 466–70.
- Léotoing, L., Manin, M., Monté, D., Baron, S., Communal, Y., Lours, C., ... Beaudoin, C. (2007). Crosstalk between androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a molecular switch for epithelial cell differentiation. *Journal of molecular endocrinology*, 39(2), 151–62.
- Li, C., Dong, S., Wang, H., & Hu, Y. (2011). Microarray analysis of gene expression changes in the brains of NR2B-induced memory-enhanced mice. *Neuroscience*, 197, 121–31.
- Li, H. (2013). Systems genetics in “-omics” era: current and future development. *Theory in biosciences*, 132(1), 1–16.
- Li, R., & Sakaguchi, H. (1997). Cholinergic innervation of the song control nuclei by the ventral paleostriatum in the zebra finch: a double-labeling study with retrograde fluorescent tracers and choline acetyltransferase immunohistochemistry. *Brain Research*, 763(2), 239–46.

- Li, X., Wang, X.-J. J., Tannenhauser, J., Podell, S., Mukherjee, P., Hertel, M., ... Gaasterland, T. (2007). Genomic resources for songbird research and their use in characterizing gene expression during brain development. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 104(16), 6834–9.
- Lipinski, S., Till, A., Sina, C., Arlt, A., Grasberger, H., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2009). DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *Journal of cell science*, 122(Pt 19), 3522–30.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., ... Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 304(5673), 1021–4.
- Livingston, F. S., & Mooney, R. (1997). Development of intrinsic and synaptic properties in a forebrain nucleus essential to avian song learning. *The Journal of neuroscience*, 17(23), 8997–9009.
- Livingston, F. S., & Mooney, R. (2001). Androgens and isolation from adult tutors differentially affect the development of songbird neurons critical to vocal plasticity. *Journal of neurophysiology*, 85(1), 34–42.
- London, S. E., & Clayton, D. F. (2010). Genomic and neural analysis of the estradiol-synthetic pathway in the zebra finch. *BMC neuroscience*, 11, 46.
- London, S. E., Dong, S., Replogle, K., & Clayton, D. F. (2009). Developmental shifts in gene expression in the auditory forebrain during the sensitive period for song learning. *Developmental neurobiology*, 69(7), 437–50.
- London, S. E., Monks, D. A., Wade, J., & Schlinger, B. A. (2006). Widespread capacity for steroid synthesis in the avian brain and song system. *Endocrinology*, 147(12), 5975–87.
- London, S. E., Remage-Healey, L., & Schlinger, B. A. (2009). Neurosteroid production in the songbird brain: A re-evaluation of core principles. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(3), 302–314.
- Long, M. A., & Fee, M. S. (2008). Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. *Nature*, 456(7219), 189–194.
- Louissaint Jr., A., Rao, S., Leventhal, C., & Goldman, S. A. (2002). Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 34(6), 945–60.
- Lovell, P. V., Clayton, D. F., Replogle, K. L., & Mello, C. V. (2008). Birdsong “transcriptomics”: neurochemical specializations of the oscine song system. *PLoS ONE*, 3(10), e3440.
- Luján, R., Shigemoto, R., & López-Bendito, G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 130(3), 567–80.
- Luo, M., Ding, L., & Perkel, D. J. (2001). An avian basal ganglia pathway essential for vocal learning forms a closed topographic loop. *The Journal of neuroscience*, 21(17), 6836–45.
- Lynch, K. S., Kleitz-Nelson, H. K., & Ball, G. F. (2013). HVC lesions modify immediate early gene expression in auditory forebrain regions of female songbirds. *Developmental neurobiology*, 73(4), 315–23.
- MacDougall-Shackleton, S. A., Hulse, S. H., & Ball, G. F. (1998). Neural bases of song preferences in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Neuroreport*, 9(13), 3047–52.
- MacFie, T. S., Poulson, R., Parker, A., Warnes, G., Boitsova, T., Nijhuis, A., ... Silver, A. (2014). DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H₂O₂ in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid. *Inflammatory bowel diseases*, 20(3), 514–24.

- MacLusky, N. J., & Naftolin, F. (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 211(4488), 1294–302.
- Maggio, N., Shavit, E., Chapman, J., & Segal, M. (2008). Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *The Journal of neuroscience*, 28(3), 732–6.
- Maine, G. N., Mao, X., Komarck, C. M., & Burstein, E. (2007). COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *The EMBO journal*, 26(2), 436–47.
- Malinin, N. L., Pluskota, E., & Byzova, T. V. (2012). Integrin signaling in vascular function. *Current opinion in hematology*, 19(3), 206–11.
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 25, 103–26.
- Margoliash, D. (1997). Functional organization of forebrain pathways for song production and perception. *Journal of neurobiology*, 33(5), 671–93.
- Marler, P. (1970). A comparative approach to vocal learning: Song development in white-crowned sparrows. *Animal behaviour*, 50(1), 83–97.
- Marler, P., Peters, S., Ball, G. F., Dufty, A. M., Wingfield, J. C., & Dufty Jr., A. M. (1988). The role of sex steroids in the acquisition and production of birdsong. *Nature*, 336(6201), 770–2.
- Marler, P., Peters, S., & Wingfield, J. (1987). Correlations between song acquisition, song production, and plasma levels of testosterone and estradiol in sparrows. *Journal of neurobiology*, 18(6), 531–48.
- Martin, L. ., Furuta, A., & Blackstone, C. (1998). AMPA receptor protein in developing rat brain: glutamate receptor-1 expression and localization change at regional, cellular, and subcellular levels with maturation. *Neuroscience*, 83(3), 917–28.
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., ... Bashir, Z. I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of neuroscience*, 24(36), 7821–8.
- Mathews, G. A., & Arnold, A. P. (1990). Antiestrogens fail to prevent the masculine ontogeny of the zebra finch song system. *General and comparative endocrinology*, 80, 48–58.
- Mathews, G. A., Brenowitz, E. A., & Arnold, A. P. (1988). Paradoxical hypermasculinization of the zebra finch song system by an antiestrogen. *Hormones and behavior*, 22(4), 540–51.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y., & Yuzaki, M. (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience*, 23(31), 10064–73.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., & Yuzaki, M. (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain research. Molecular brain research*, 100(1-2), 43–52.
- Mattila, E., Auvinen, K., Salmi, M., & Ivaska, J. (2008). The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *Journal of cell science*, 121(21), 3570–80.
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(6), 446–54.

- McCarthy, M. M. (2008). Estradiol and the Developing Brain. *Physiological reviews*, 88(1), 91–134.
- McCarthy, M. M. (2010). How it's made: organisational effects of hormones on the developing brain. *Journal of neuroendocrinology*, 22(7), 736–42.
- McCarthy, M. M., & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature neuroscience*, 14(6), 677–83.
- McCasland, J. S. (1987). Neuronal control of bird song production. *The Journal of neuroscience*, 7(1), 23–39.
- McCasland, J. S., & Konishi, M. (1981). Interaction between auditory and motor activities in an avian song control nucleus. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 78(12), 7815–9.
- McDonald, K. S., & Kirn, J. R. (2012). Anatomical plasticity in the adult zebra finch song system. *The Journal of comparative neurology*, 520(16), 3673–86.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocrine reviews*, 20, 321–44.
- Mei, L., & Nave, K.-A. (2014). Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron*, 83(1), 27–49.
- Mello, C. V, Pinaud, R., & Ribeiro, S. (1998). Noradrenergic system of the zebra finch brain: immunocytochemical study of dopamine-beta-hydroxylase. *The Journal of comparative neurology*, 400(2), 207–28.
- Merten, M. D., & Stocker-Buschina, S. (1995). Fadrozole induces delayed effects on neurons in the zebra finch song system. *Brain research*, 671(2), 317–20.
- Metzdorf, R., Gahr, M., & Fusani, L. (1999). Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. *The Journal of comparative neurology*, 407(1), 115–29.
- Michaelson, M. D. D., Mehler, M. F., Xu, H., Gross, R. E., & Kessler, J. A. (1996). Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain. *Developmental biology*, 179(1), 251–63.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., Ciociola, A., Lombardi, M., De Falco, A., ... Auricchio, F. (2006). Crosstalk between EGFR and extranuclear steroid receptors. *Annals of the New York academy of sciences*, 1089, 194–200.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., & Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO journal*, 15(6), 1292–300.
- Milner, R., & Campbell, I. L. (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *Journal of neuroscience research*, 69(3), 286–91.
- Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P. M., & Chin, W. W. (1998). Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*, 139(5), 2493–500.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1), 56–68.
- Mooney, R., & Prather, J. F. (2005). The HVC microcircuit: the synaptic basis for interactions between song motor and vocal plasticity pathways. *The Journal of neuroscience*, 25(8), 1952–64.

- Mooney, R., & Rao, M. (1994). Waiting periods versus early innervation: the development of axonal connections in the zebra finch song system. *The Journal of neuroscience*, 14(11), 6532–43.
- Morris, D. (1954). *JSTOR: Behaviour*, 4(6), 271–322.
- Morris, J. A., Jordan, C. L., & Breedlove, S. M. (2004). Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nature neuroscience*, 7(10), 1034–9.
- Morrison, B. M., Lee, Y., & Rothstein, J. D. (2013). Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends in cell biology*, 23(12), 644–51.
- Morrison, R. G., & Nottebohm, F. (1993). Role of a telencephalic nucleus in the delayed song learning of socially isolated zebra finches. *Journal of neurobiology*, 24(8), 1045–64.
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., Murakami, G., Hojo, Y., Ishii, H., ... Kawato, S. (2006). Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology*, 84(4), 255–63.
- Murphy, K. M., Beston, B. R., Boley, P. M., & Jones, D. G. (2005). Development of human visual cortex: a balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Developmental psychobiology*, 46(3), 209–21.
- Nakamori, T., Sato, K., Atoji, Y., Kanamatsu, T., Tanaka, K., & Ohki-Hamazaki, H. (2010). Demonstration of a neural circuit critical for imprinting behavior in chicks. *The Journal of neuroscience*, 30(12), 4467–80.
- Nase, G., Weishaupt, J., Stern, P., Singer, W., & Monyer, H. (1999). Genetic and epigenetic regulation of NMDA receptor expression in the rat visual cortex. *The European journal of neuroscience*, 11(12), 4320–6.
- Nealen, P. M. (2005). An interspecific comparison using immunofluorescence reveals that synapse density in the avian song system is related to sex but not to male song repertoire size. *Brain research*, 1032, 50–62.
- Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., & Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(1), 13–9.
- Nixdorf-Bergweiler, B. E. (1996). Divergent and parallel development in volume sizes of telencephalic song nuclei in male and female zebra finches. *The Journal of comparative neurology*, 375(3), 445–56.
- Nixdorf-Bergweiler, B. E., Wallhäusser-Franke, E., & DeVoogd, T. J. (1995). Regressive development in neuronal structure during song learning in birds. *Journal of neurobiology*, 27(2), 204–15.
- Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (1988). Sex and regional differences in the incorporation of neurons born during song learning in zebra finches. *The Journal of neuroscience*, 8(8), 2869–74.
- Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (1989). Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence. *Brain research. Developmental brain research*, 49(1), 27–32.
- Nordeen, E. J., Nordeen, K. W., & Arnold, A. P. (1987). Sexual differentiation of androgen accumulation within the zebra finch brain through selective cell loss and addition. *The Journal of comparative neurology*, 259(3), 393–9.
- Nordeen, K. W., & Nordeen, E. J. (1988). Projection neurons within a vocal motor pathway are born during song learning in zebra finches. *Nature*, 334(6178), 149–51.

- Nordeen, K. W., & Nordeen, E. J. (1993). Long-term maintenance of song in adult zebra finches is not affected by lesions of a forebrain region involved in song learning. *Behavioral and neural biology*, 59(1), 79–82.
- Nottebohm, F. (1992). The search for neural mechanisms that define the sensitive period for song learning in birds. *Netherlands journal of zoology*, 43(1), 193–234.
- Nottebohm, F. (2002). Neuronal replacement in adult brain. *Brain research bulletin*, 57(6), 737–49.
- Nottebohm, F., & Arnold, A. P. (1976). Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science*, 194(4261), 211–3.
- Nottebohm, F., Kelley, D. B., & Paton, J. A. (1982). Connections of vocal control nuclei in the canary telencephalon. *The Journal of comparative neurology*, 207(4), 344–57.
- Nottebohm, F., Stokes, T. M., & Leonard, C. M. (1976). Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *The Journal of comparative neurology*, 165(4), 457–86.
- O'Dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H., ... George, S. R. (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47(2), 310–3.
- Odom, K. J., Hall, M. L., Riebel, K., Omland, K. E., & Langmore, N. E. (2014). Female song is widespread and ancestral in songbirds. *Nature communications*, 5, 3379.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B. S., & Sakuma, Y. (2002). Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 99(5), 3306–11.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences*, 12, 357–8.
- Pan, W., Stone, K. P., Hsueh, H., Manda, V. K., Zhang, Y., & Kastin, A. J. (2011). Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Current pharmaceutical design*, 17(33), 3729–40.
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48), 7906–9.
- Pattarozzi, A., Gatti, M., Barbieri, F., Würth, R., Porcile, C., Lunardi, G., ... Florio, T. (2008). 17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment. *Molecular pharmacology*, 73(1), 191–202.
- Pawlisch, B. A., & Remage-Healey, L. (2015). Neuroestrogen signaling in the songbird auditory cortex propagates into a sensorimotor network via an “interface” nucleus. *Neuroscience*, 284C, 522–35.
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., Hughes, C. C. W., & Levin, E. R. (2002). Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *The Journal of biological chemistry*, 277(52), 50768–75.
- Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular endocrinology*, 20, 1996–2009.
- Perkel, D. J., & Farries, M. A. (2000). Complementary “bottom-up” and “top-down” approaches to basal ganglia function. *Current opinion in neurobiology*, 10(6), 725–31.

- Person, A. L., Gale, S. D., Farries, M. A., & Perkel, D. J. (2008). Organization of the songbird basal ganglia, including area X. *The Journal of comparative neurology*, 508(5), 840–66.
- Peters, A., Palay, S. L., & Webster, H. deF. (1991). *Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*, Oxford University Press, USA.
- Peterson, R. S., Yarram, L., Schlinger, B. A., & Saldanha, C. J. (2005). Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 272(1576), 2089–96.
- Pettersson, K., Delaunay, F., & Gustafsson, J. A. (2000). Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*, 19(43), 4970–8.
- Philpot, B. D., Sekhar, A. K., Shouval, H. Z., & Bear, M. F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron*, 29(1), 157–69.
- Phoenix, C. H., Goy, R. W., Gerall, A. A., & Young, W. C. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65, 369–82.
- Pinal, C. S., & Tobin, A. J. (1998). Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspectives on developmental neurobiology*, 5(2-3), 109–18.
- Pinaud, R., & Mello, C. V. (2007). GABA immunoreactivity in auditory and song control brain areas of zebra finches, *Journal of chemical neuroanatomy*, 34(1-2), 1–21.
- Pohl-Apel, G. (1985). The correlation between the degree of brain masculinization and song quality in estradiol treated female zebra finches. *Brain research*, 336(2), 381–3.
- Poot, H. (2013). So happy together, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). Neural cell adhesion molecule-180-mediated homophilic binding induces epidermal growth factor receptor (EGFR) down-regulation and uncouples the inhibitory function of EGFR in neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry*, 104(3), 624–39.
- Pradhan, D. S., Yu, Y., & Soma, K. K. (2008). Rapid estrogen regulation of DHEA metabolism in the male and female songbird brain. *Journal of neurochemistry*, 104(1), 244–53.
- Prather, J. F. (2013). Auditory signal processing in communication: perception and performance of vocal sounds. *Hearing research*, 305, 144–55.
- Prather, J. F., Peters, S., Nowicki, S., & Mooney, R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*, 451(7176), 305–10.
- Price, P. H. (1979). Developmental determinants of structure in zebra finch song. *Journal of comparative and physiological psychology*, 93(2), 260–77.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., & Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of neuroscience*, 26(27), 7212–21.
- Pringle, N. P., Mudhar, H. S., Collarini, E. J., & Richardson, W. D. (1992). PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development*, 115(2), 535–51.

- Prithviraj, R., & Inglis, F. M. (2008). Expression of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3B regulates dendrite morphogenesis in spinal motor neurons. *Neuroscience*, 155(1), 145–53.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 95(1), 340–5.
- Pytte, C. L., George, S., Korman, S., David, E., Bogdan, D., & Kirn, J. R. (2012). Adult neurogenesis is associated with the maintenance of a stereotyped, learned motor behavior. *The Journal of neuroscience*, 32(20), 7052–7.
- Pytte, C. L., Gerson, M., Miller, J., & Kirn, J. R. (2007). Increasing stereotypy in adult zebra finch song correlates with a declining rate of adult neurogenesis. *Developmental neurobiology*, 67, 1699–720.
- Quispe, R., Trappschuh, M., Gahr, M., & Goymann, W. (2015). Towards more physiological manipulations of hormones in field studies: Comparing the release dynamics of three kinds of testosterone implants: Silastic tubing, time-release pellets and beeswax. *General and comparative endocrinology*. doi:10.1016/j.ygcen.2015.01.007
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., & Levin, E. R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular endocrinology*, 13, 307–19.
- Reichling, D. B., Kyrozis, A., Wang, J., & MacDermott, A. B. (1994). Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *The Journal of physiology*, 476(3), 411–21.
- Reimand, J., Arak, T., & Vilo, J. (2011). g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic acids research*, 39(S2), W307–15.
- Reimers, K., Choi, C. Y. U., Bucan, V., & Vogt, P. M. (2008). The Bax Inhibitor-1 (BI-1) family in apoptosis and tumorigenesis. *Current molecular medicine*, 8(2), 148–56.
- Reiner, A., Perkel, D. J., Mello, C. V., & Jarvis, E. D. (2004). Songbirds and the revised avian brain nomenclature. *Annals of the New York academy of sciences*, 1016, 77–108.
- Remage-Healey, L., Dong, S. M., Chao, A., & Schlinger, B. A. (2012). Sex-specific, rapid neuroestrogen fluctuations and neurophysiological actions in the songbird auditory forebrain. *Journal of neurophysiology*, 107(6), 1621–31.
- Remage-Healey, L., Jeon, S. D., & Joshi, N. R. (2013). Recent evidence for rapid synthesis and action of estrogens during auditory processing in a songbird. *Journal of neuroendocrinology*, 25(11), 1024–31.
- Remage-Healey, L., & Joshi, N. R. (2012). Changing neuroestrogens within the auditory forebrain rapidly transform stimulus selectivity in a downstream sensorimotor nucleus. *The Journal of neuroscience*, 32(24), 8231–41.
- Remage-Healey, L., London, S. E., & Schlinger, B. A. (2010). Birdsong and the neural production of steroids. *Journal of chemical neuroanatomy*, 39(2), 72–81.
- Remage-Healey, L., Oyama, R. K., & Schlinger, B. A. (2009). Elevated aromatase activity in forebrain synaptic terminals during song. *Journal of neuroendocrinology*, 21(3), 191–9.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307(5715), 1625–30.
- Ribeiro, J. R., & Freiman, R. N. (2014). Estrogen signaling crosstalk: Implications for endocrine resistance in ovarian cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, 160–73.

- Ritter, L. M., Vazquez, D. M., & Meador-Woodruff, J. H. (2002). Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Developmental brain research*, 139(2), 227–36.
- Roper, A., & Zann, R. (2006). The onset of song learning and song tutor selection in fledgling Zebra finches. *Ethology*, 112(5), 458–70.
- Ropero, A. B., Soria, B., & Nadal, A. (2002). A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Molecular endocrinology*, 16(3), 497–505.
- Rose, S. P. ., & Stewart, M. G. (1999). Cellular correlates of stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behavioural brain research*, 98(2), 237–43.
- Rosen, M. J., & Mooney, R. (2003). Inhibitory and excitatory mechanisms underlying auditory responses to learned vocalizations in the songbird nucleus HVC. *Neuron*, 39(1), 177–94.
- Rosen, M. J., & Mooney, R. (2006). Synaptic interactions underlying song-selectivity in the avian nucleus HVC revealed by dual intracellular recordings. *Journal of neurophysiology*, 95(2), 1158–75.
- Rupp, F., Payan, D. G., Magill-Solc, C., Cowan, D. M., & Scheller, R. H. (1991). Structure and expression of a rat agrin. *Neuron*, 6(5), 811–23.
- Ryan, S. M., & Arnold, A. P. (1981). Evidence for cholinergic participation in the control of bird song; acetylcholinesterase distribution and muscarinic receptor autoradiography in the zebra finch brain. *The Journal of comparative neurology*, 202(2), 211–9.
- Sakaguchi, H., Li, R., & Taniguchi, I. (2000). Sex differences in the ventral paleostriatum of the zebra finch. *NeuroReport*, 11(12), 2727–31.
- Sakaguchi, H., & Saito, N. (1989). The acetylcholine and catecholamine contents in song control nuclei of zebra finch during song ontogeny. *Brain research. Developmental brain research*, 47(2), 313–7.
- Sakaguchi, H., & Saito, N. (1991). Developmental change of cholinergic activity in the forebrain of the zebra finch during song learning. *Brain research. Developmental brain research*, 62(2), 223–8.
- Sakaguchi, H., Wada, K., Maekawa, M., Watsuji, T., & Hagiwara, M. (1999). Song-induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the songbird brain. *The Journal of neuroscience*, 19(10), 3973–81.
- Sakuma, Y. (2009). Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *Journal of neuroendocrinology*, 21(4), 410–4.
- Saldanha, C. J., Duncan, K. A., & Walters, B. J. (2009). Neuroprotective actions of brain aromatase, *Frontiers in endocrinology*, 30(2), 106–18.
- Saldanha, C. J., & Schlinger, B. A. (2008). Steroidogenesis and neuroplasticity in the songbird brain. *Neuroactive Steroids in Brain Function, Behavior and Neuropsychiatric Disorders*, (Buchkapitel), Springer, 201–16.
- Sällman Almén, M., Bringeland, N., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2012). The dispanins: a novel gene family of ancient origin that contains 14 human members. *PloS one*, 7(2), e31961.
- Sasaki, R. (2003). Pleiotropic functions of erythropoietin. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 42(2), 142–9.
- Scharff, C., & Nottebohm, F. (1991). A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. *The Journal of neuroscience*, 11(9), 2896–913.

- Scharff, C., Nottebohm, F., & Cynx, J. (1998). Conspecific and heterospecific song discrimination in male zebra finches with lesions in the anterior forebrain pathway. *Journal of neurobiology*, 36(1), 81–90.
- Scharfman, H. E., & MacLusky, N. J. (2006). Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Frontiers in endocrinology*, 27(4), 415–35.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467–70.
- Schielzeth, H., & Bolund, E. (2010). Patterns of conspecific brood parasitism in zebra finches. *Animal behaviour*, 79(6), 1329–37.
- Schiff, B. A., McMurphy, A. B., Jasser, S. A., Younes, M. N., Doan, D., Yigitbasi, O. G., ... Myers, J. N. (2004). Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clinical cancer research*, 10(24), 8594–602.
- Schlinger, B. A. (1994). Estrogens and song: Products of the songbird brain. *Bioscience*, 44(9), 605–12.
- Schlinger, B. A. (1997). Sex steroids and their actions on the birdsong system. *Journal of neurobiology*, 33(5), 619–31.
- Schlinger, B. A., Amur-Umarjee, S., Shen, P., Campagnoni, A. T., & Arnold, A. P. (1994). Neuronal and non-neuronal aromatase in primary cultures of developing zebra finch telencephalon. *The Journal of neuroscience*, 14(12), 7541–52.
- Schlinger, B. A., & Arnold, A. P. (1991). Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain research*, 561(1), 99–105.
- Schlinger, B. A., & Arnold, A. P. (1992). Plasma sex steroids and tissue aromatization in hatchling zebra finches: implications for the sexual differentiation of singing behavior. *Endocrinology*, 130(1), 289–99.
- Schlinger, B. A., & Ramage-Healey, L. (2012). Neurosteroidogenesis: insights from studies of songbirds. *Journal of neuroendocrinology*, 24(1), 16–21.
- Schlinger, B. A., Ramage-Healey, L., & Rensel, M. (2014). Establishing regional specificity of neuroestrogen action. *General and comparative endocrinology*, 205, 235–41.
- Schmidt, M. F., & Perkel, D. J. (1998). Slow synaptic inhibition in nucleus HVC of the adult zebra finch. *The Journal of neuroscience*, 18(3), 895–904.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), 3.
- Schwarz, J. M., & McCarthy, M. M. (2008a). Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *Journal of neurochemistry*, 105(5), 1561–72.
- Schwarz, J. M., & McCarthy, M. M. (2008b). The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. *Hormones and behavior*, 54(5), 662–8.
- Scott, L. L., Singh, T. D., Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (2004). Developmental patterns of NMDAR expression within the song system do not recur during adult vocal plasticity in zebra finches. *Journal of neurobiology*, 58(4), 442–54.

- Semenova, S., Contet, C., Roberts, A. J., & Markou, A. (2012). Mice lacking the $\beta 4$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor show memory deficits, altered anxiety- and depression-like behavior, and diminished nicotine-induced analgesia. *Nicotine & tobacco research*, 14(11), 1346–55.
- Senechal, Y., Kelly, P. H., & Dev, K. K. (2008). Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behavioural brain research*, 186(1), 126–32.
- Sexton, T., Buhr, E., & Van Gelder, R. N. (2012). Melanopsin and mechanisms of non-visual ocular photoreception. *The Journal of biological chemistry*, 287(3), 1649–56.
- Seyedabadi, M., Fakhfour, G., Ramezani, V., Mehr, S. E., & Rahimian, R. (2014). The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Experimental brain research*, 232(3), 723–38.
- Shaevitz, S. S., & Theunissen, F. E. (2007). Functional connectivity between auditory areas field L and CLM and song system nucleus HVC in anesthetized zebra finches. *Journal of neurophysiology*, 98(5), 2747–64.
- Shea, S. D., Koch, H., Baleckaitis, D., Ramirez, J.-M., & Margoliash, D. (2010). Neuron-specific cholinergic modulation of a forebrain song control nucleus. *Journal of neurophysiology*, 103(2), 733–45.
- Shea, S. D., & Margoliash, D. (2003). Basal forebrain cholinergic modulation of auditory activity in the zebra finch song system. *Neuron*, 40(6), 1213–26.
- Sieghart, W., & Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(8), 795–816.
- Simpson, H. B., & Vicario, D. S. (1990). Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. *The Journal of neuroscience*, 10(5), 1541–56.
- Simpson, H. B., & Vicario, D. S. (1991). Early estrogen treatment of female zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *Journal of neurobiology*, 22(7), 777–93.
- Singh, M., & Su, C. (2013). Progesterone, brain-derived neurotrophic factor and neuroprotection. *Neuroscience*, 239, 84–91.
- Singh, T. D., Basham, M. E., Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (2000). Early sensory and hormonal experience modulate age-related changes in NR2B mRNA within a forebrain region controlling avian vocal learning. *Journal of neurobiology*, 44(1), 82–94.
- Slater, P., Eales, L., & Clayton, N. (1988). Song learning in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): progress and prospects. In: Rosenblatt J, Beer C, Busnel MC, Slater PJB, editors. *Advances in the study of behaviour*, 18, San Diego: Academic, 1–32.
- Soderstrom, K., Qin, W., & Leggett, M. H. (2007). A minimally invasive procedure for sexing young zebra finches. *Journal of neuroscience methods*, 164(1), 116–9.
- Soha, J. A., Shimizu, T., & Doupe, A. J. (1996). Development of the catecholaminergic innervation of the song system of the male zebra finch. *Journal of neurobiology*, 29(4), 473–89.
- Sohrabji, F., Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (1990). Selective impairment of song learning following lesions of a forebrain nucleus in the juvenile zebra finch. *Behavioral and neural biology*, 53(1), 51–63.
- Sohrabji, F., & Williams, M. (2013). Stroke neuroprotection: oestrogen and insulin-like growth factor-1 interactions and the role of microglia. *Journal of neuroendocrinology*, 25(11), 1173–81.

- Solis, M. M., & Perkel, D. J. (2005). Rhythmic activity in a forebrain vocal control nucleus *in vitro*. *The Journal of neuroscience*, 25(11), 2811–22.
- Soltysik, K., & Czekaj, P. (2013). Membrane estrogen receptors – Is it an alternative way of estrogen action? *Journal of physiology and pharmacology*, 64(2), 129–42.
- Sossinka, R., Pröve, E., & Kalberlah, H. H. (1975). [Effect of testosterone on the beginning of singing in the zebra finch (*Taeniopygia guttata castanotis*)]. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, (39), 259–64.
- Spiro, J. E., Dalva, M. B., & Mooney, R. (1999). Long-range inhibition within the zebra finch song nucleus RA can coordinate the firing of multiple projection neurons. *Journal of neurophysiology*, 81(6), 3007–20.
- Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems*, 4(8), 835–50.
- Striedter, G. F. (1994). The vocal control pathways in budgerigars differ from those in songbirds. *The Journal of comparative neurology*, 343(1), 35–56.
- Strom, J. O., Theodorsson, A., & Theodorsson, E. (2011). Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*, 12(3), 1533–62.
- Suh, A., Paus, M., Kiefmann, M., Churakov, G., Franke, F. A., Brosius, J., ... Schmitz, J. (2011). Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. *Nature communications*, 2, 443.
- Suhardja, A., & Hoffman, H. (2003). Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells. *Microscopy research and technique*, 60(1), 70–5.
- Suthers, R. A., Goller, F., & Pytte, C. (1999). The neuromuscular control of birdsong. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series B, biological sciences*, 354(1385), 927–39.
- Takahashi, T., Feldmeyer, D., Suzuki, N., Onodera, K., Cull-Candy, S. G., Sakimura, K., & Mishina, M. (1996). Functional correlation of NMDA receptor epsilon subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. *The Journal of neuroscience*, 16(14), 4376–82.
- Tam, H., & Schlinger, B. A. (2007). Activities of 3[beta]-HSD and aromatase in slices of developing and adult zebra finch brain. *General and comparative endocrinology*, 150(1), 26–33.
- Tang, Y. P., Peabody, C., Tomaszewski, M. L., & Wade, J. (2007). Sexually dimorphic SCAMP1 expression in the forebrain motor pathway for song production of juvenile zebra finches. *Developmental neurobiology*, 67(4), 474–82.
- Tang, Y. P., & Wade, J. (2012). 17 β -Estradiol regulates the sexually dimorphic expression of BDNF and TrkB proteins in the song system of juvenile Zebra finches. *PLoS one*, 7(8), e43687.
- Thode, C., Güttinger, H. R., & Darlison, M. G. (2008). Expression of the GABA(A) receptor gamma4-subunit gene in discrete nuclei within the zebra finch song system. *Neuroscience*, 157(1), 143–52.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146(2), 624–32.
- Thompson, C. K., Meitzen, J., Replogle, K., Drnevich, J., Lent, K. L., Wissman, A. M., ... Brenowitz, E. A. (2012). Seasonal changes in patterns of gene expression in avian song control brain regions. *PLoS one*, 7(4), e35119.

- Thompson, J. A., & Johnson, F. (2007). HVC microlesions do not destabilize the vocal patterns of adult male zebra finches with prior ablation of LMAN. *Developmental neurobiology*, 67(2), 205–18.
- Thompson, J. B., Dzubur, E., Wade, J., & Tomaszycki, M. (2011). The effects of estradiol on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV and androgen receptor expression in the developing zebra finch song system. *Brain research*, 1401, 66–73.
- Thorpe, W. H. (1954). The process of song-learning in the Chaffinch as studied by means of the sound spectrograph. *Nature*, 173(4402), 465–9.
- Thorpe, W. H. (1958). The learning of song patterns by birds, with especial reference to the song of the chaffinch *fringilla coelebs*. *Ibis*, 100(4), 535–70.
- Tobet, S., Knoll, J. G., Hartshorn, C., Aurand, E., Stratton, M., Kumar, P., ... McClellan, K. (2009). Brain sex differences and hormone influences: a moving experience? *Journal of neuroendocrinology*, 21(4), 387–92.
- Toft, D., & Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 55(6), 1574–81.
- Tomita, S., & Castillo, P. E. (2012). Neto1 and Neto2: auxiliary subunits that determine key properties of native kainate receptors. *The Journal of physiology*, 590(10), 2217–23.
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of neuroscience*, 19, 4180–8.
- Tramontin, A. D., & Brenowitz, E. A. (2000). Seasonal plasticity in the adult brain. *Trends in Neurosciences*, 23, 251–8.
- Tramontin, A. D., Wingfield, J. C., & Brenowitz, E. A. (2003). Androgens and estrogens induce seasonal-like growth of song nuclei in the adult songbird brain. *Journal of neurobiology*, 57(2), 130–40.
- Tremere, L. A., Kovaleski, R. F., Burrows, K., Jeong, J. K., & Pinaud, R. (2012). Mechanistic basis and functional roles of long-term plasticity in auditory neurons induced by a brain-generated estrogen. *The Journal of neuroscience*, 32(46), 16478–95.
- Triplett, J. W., & Feldheim, D. A. (2012). Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(1), 7–15.
- Tropea, D., Kreiman, G., Lyckman, A., Mukherjee, S., Yu, H., Horng, S., & Sur, M. (2006). Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nature neuroscience*, 9(5), 660–8.
- Tropea, D., Van Wart, A., & Sur, M. (2009). Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series B, biological sciences*, 364(1515), 341–55.
- Tsukahara, S., Hojo, R., Kuroda, Y., & Fujimaki, H. (2008). Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. *Neuroscience letters*, 432(1), 58–63.
- Tsukahara, S., Kakeyama, M., & Toyofuku, Y. (2006). Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *Journal of neurobiology*, 66(13), 1411–9.

- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 98(9), 5116–21.
- Van der Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research*, 305(3), 285–98.
- Van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cellular and molecular life sciences*, 67(10), 1567–79.
- Vanacker, J.-M. (1999). Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR (Estrogen Receptor-Related Receptor). *Molecular endocrinology*, 13(5), 764–73.
- Vates, G. E., & Nottebohm, F. (1995). Feedback circuitry within a song-learning pathway. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(11), 5139–43.
- Vates, G. E., Vicario, D. S., & Nottebohm, F. (1997). Reafferent thalamo- “cortical” loops in the song system of oscine songbirds. *The Journal of comparative neurology*, 380(2), 275–90.
- Vellema, M., Hertel, M., Urbanus, S. L., Van der Linden, A., & Gahr, M. (2014). Evaluating the predictive value of doublecortin as a marker for adult neurogenesis in canaries (*Serinus canaria*). *The Journal of comparative neurology*, 522(6), 1299–315.
- VennDiagramPlotter: Portions of this research were supported by the W.R. Wiley Environmental Molecular Science Laboratory, a national scientific user facility sponsored by the U.S. Department of Energy's Office of Biological and Environmental Research and located at PNNL. PNNL is operated by Battelle Memorial Institute for the U.S. Department of Energy under contract DE-AC05-76RL0 1830.
- Vicario, D. S. (1991). Neural mechanisms of vocal production in songbirds. *Current opinion in neurobiology*, 1(4), 595–600.
- Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Andò, S., & Maggiolini, M. (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Molecular endocrinology*, 20(3), 631–46.
- Vu, E., Mazurek, M., & Kuo, Y. (1994). Identification of a forebrain motor programming network for the learned song of zebra finches. *The Journal of neuroscience.*, 14(11), 6924–34.
- Wada, K., Sakaguchi, H., Jarvis, E. D., & Hagiwara, M. (2004). Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization. *The Journal of comparative neurology*, 476(1), 44–64.
- Wade, J. (2001). Zebra finch sexual differentiation: the aromatization hypothesis revisited. *Microscopy research and technique*, 54(6), 354–63.
- Wade, J., & Arnold, A. P. (1994). Post-hatching inhibition of aromatase activity does not alter sexual differentiation of the zebra finch song system. *Brain research*, 639(2), 347–50.
- Wade, J., & Arnold, A. P. (2004). Sexual differentiation of the zebra finch song system. *Annals of the New York academy of sciences*, 1016, 540–59.
- Wade, J., Buhlman, L., & Swender, D. (2002). Post-hatching hormonal modulation of a sexually dimorphic neuromuscular system controlling song in zebra finches. *Brain research*, 929(2), 191–201.
- Wade, J., Peabody, C., Tang, Y. P., Qi, L., & Burnett, R. (2013). Estradiol modulates neurotransmitter concentrations in the developing zebra finch song system. *Brain research*, 1517, 87–92.

- Wade, J., Schlinger, B. A., Hodges, L., & Arnold, A. P. (1994). Fadrozole: a potent and specific inhibitor of aromatase in the zebra finch brain. *General and comparative endocrinology*, 94(1), 53–61.
- Wade, J., Swender, D. A., & McElhinny, T. L. (1999). Sexual differentiation of the zebra finch song system parallels genetic, not gonadal, sex. *Hormones and behavior*, 36, 141–52.
- Wade, J., Tang, Y. P., Peabody, C., & Tempelman, R. J. (2005). Enhanced gene expression in the forebrain of hatchling and juvenile male zebra finches. *Journal of neurobiology*, 64(2), 224–38.
- Wallace, T. L., & Bertrand, D. (2013). Alpha7 neuronal nicotinic receptors as a drug target in schizophrenia. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(2), 139–55.
- Wallhäuser-Franke, E., Nixdorf-Bergweiler, B. E., & DeVoogd, T. J. (1995). Song isolation is associated with maintaining high spine frequencies on zebra finch 1MAN neurons. *Neurobiology of learning and memory*, 64(1), 25–35.
- Walters, B. J., Alexiades, N. G., & Saldanha, C. J. (2011). Intracerebral estrogen provision increases cytotgenesis and neurogenesis in the injured zebra finch brain. *Developmental neurobiology*, 71(2), 170–81.
- Walters, M. J., Collado, D., & Harding, C. F. (1991). Oestrogenic modulation of singing in male zebra finches: differential effects on directed and undirected songs. *Animal behaviour*, 42(3), 445–52.
- Walton, C., Pariser, E., & Nottebohm, F. (2012). The zebra finch paradox: song is little changed, but number of neurons doubles. *The Journal of neuroscience*, 32(3), 761–74.
- Wang, N., Hurley, P., Pytte, C., & Kirn, J. R. (2002). Vocal control neuron incorporation decreases with age in the adult Zebra finch. *The Journal of neuroscience*, 22(24), 10864–70.
- Wang, Y., Brzozowska-Precht, A., & Karten, H. J. (2010). Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 107(28), 12676–81.
- Wang, Y., & Rekaya, R. (2009). A comprehensive analysis of gene expression evolution between humans and mice. *Evolutionary bioinformatics*, 5, 81–90.
- Warren, W. C., Clayton, D. F., Ellegren, H., Arnold, A. P., Hillier, L. W., Kunstner, A., ... Wilson, R. K. (2010). The genome of a songbird. *Nature*, 464(7289), 757–62.
- Watakabe, A., Komatsu, Y., Sadakane, O., Shimegi, S., Takahata, T., Higo, N., ... Yamamori, T. (2009). Enriched expression of serotonin 1B and 2A receptor genes in macaque visual cortex and their bidirectional modulatory effects on neuronal responses. *Cerebral cortex*, 19(8), 1915–28.
- Waters, E. M., & Simerly, R. B. (2009). Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. *The Journal of neuroscience*, 29(31), 9714–8.
- Watson, J. T., Adkins-Regan, E., Whiting, P., Lindstrom, J. M., & Podleski, T. R. (1988). Autoradiographic localization of nicotinic acetylcholine receptors in the brain of the zebra finch (*Poephila guttata*). *The Journal of comparative neurology*, 274(2), 255–64.
- Weiss, R. A., & Vogt, P. K. (2011). 100 years of Rous sarcoma virus. *The Journal of experimental medicine*, 208(12), 2351–5.
- Wennstrom, K. L., Reeves, B. J., & Brenowitz, E. A. (2001). Testosterone treatment increases the metabolic capacity of adult avian song control nuclei. *Journal of neurobiology*, 48(4), 256–64.

- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093–7.
- Wilbrecht, L., Williams, H., Gangadhar, N., & Nottebohm, F. (2006). High levels of new neuron addition persist when the sensitive period for song learning is experimentally prolonged. *The Journal of neuroscience*, 26(36), 9135–41.
- Wild. (1997). Neural pathways for the control of birdsong production. *Journal of neurobiology*, 33(5), 653–70.
- Wild, J. M. (1993a). Descending projections of the songbird nucleus robustus archistriatalis. *The Journal of comparative neurology*, 338(2), 225–41.
- Wild, J. M. (1993b). The avian nucleus retroambigialis: a nucleus for breathing, singing and calling. *Brain research*, 606(2), 319–24.
- Wild, J. M. (1994). Visual and somatosensory inputs to the avian song system via nucleus uvulaeformis (Uva) and a comparison with the projections of a similar thalamic nucleus in a nonsongbird, *Columba livia*. *The Journal of comparative neurology*, 349(4), 512–35.
- Wild, J. M., Williams, M. N., Howie, G. J., & Mooney, R. (2005). Calcium-binding proteins define interneurons in HVC of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *The Journal of comparative neurology*, 483(1), 76–90.
- Wild, & M Wild, J. (1997). Neural pathways for the control of birdsong production. *Journal of neurobiology*, 33(5), 653–70.
- Williams, G. V, Rao, S. G., & Goldman-Rakic, P. S. (2002). The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *The Journal of neuroscience*, 22(7), 2843–54.
- Wilson, M. E., Dimayuga, F. O., Reed, J. L., Curry, T. E., Anderson, C. F., Nath, A., & Bruce-Keller, A. J. (2006). Immune modulation by estrogens: role in CNS HIV-1 infection. *Endocrine*, 29(2), 289–97.
- Wingfield, J. C., & Farner, D. S. (1975). The determination of five steroids in avian plasma by radioimmunoassay and competitive protein-binding. *Steroids*, 26(3), 311–21.
- Wood, W. E., Lovell, P. V, Mello, C. V, & Perkel, D. J. (2011). Serotonin, via HTR₂ receptors, excites neurons in a cortical-like premotor nucleus necessary for song learning and production. *The Journal of neuroscience*, 31(39), 13808–15.
- Wood, W. E., Roseberry, T. K., & Perkel, D. J. (2013). HTR₂ receptors in a songbird premotor cortical-like area modulate spectral characteristics of zebra finch song. *The Journal of neuroscience*, 33(7), 2908–15.
- Wright, C. L., Schwarz, J. S., Dean, S. L., & McCarthy, M. M. (2010). Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends in endocrinology and metabolism*, 21(9), 553–61.
- Wu, C., & Sun, D. (2014). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metabolic brain disease*. DOI: 10.1007/s11011-014-9560-1.
- Wu, S., & Li, J. (2007). Comparative analysis of gene-coexpression networks across species. *Bioinformatics research and applications, proceedings*, 4463, 615–26.
- Wu, T.-W., Chen, S., & Brinton, R. D. (2011). Membrane estrogen receptors mediate calcium signaling and MAP kinase activation in individual hippocampal neurons. *Brain research*, 1379, 34–43.

- Wu, M. V., & Shah, N. M. (2011). Control of masculinization of the brain and behavior. *Current opinion in neurobiology*, 21(1), 116–23.
- Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R., & Hardingham, G. E. (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, 74, 4–17.
- Yamamura, T., Barker, J. M., Balthazart, J., & Ball, G. F. (2011). Androgens and estrogens synergistically regulate the expression of doublecortin and enhance neuronal recruitment in the song system of adult female canaries. *The Journal of neuroscience*, 31(26), 9649–57.
- Yamazaki, S., Alones, V., & Menaker, M. (2002). Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *Journal of biological rhythms*, 17, 315–29.
- Yang, L., Duff, M. O., Graveley, B. R., Carmichael, G. G., & Chen, L.-L. (2011). Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome biology*, 12, R16.
- Ye, P., Xing, Y., Dai, Z., & D’Ercole, A. J. (1996). In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain research. Developmental brain research*, 95(1), 44–54.
- Yip, Z. C., Miller-Sims, V. C., & Bottjer, S. W. (2012). Morphology of axonal projections from the high vocal center to vocal motor cortex in songbirds. *The Journal of comparative neurology*, 520(12), 2742–56.
- Young, S. M., & Neher, E. (2009). Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. *Neuron*, 63(4), 482–96.
- Yu, Y.-C., Cao, L.-H., & Yang, X.-L. (2006). Modulation by brain natriuretic peptide of GABA receptors on rat retinal ON-type bipolar cells. *The Journal of neuroscience*, 26(2), 696–707.
- Yuen, G. S., McEwen, B. S., & Akama, K. T. (2011). LIM kinase mediates estrogen action on the actin depolymerization factor Cofilin. *Brain research*, 1379, 44–52.
- Zann, R. A. (1996). *The Zebra Finch: A Synthesis of Field and Laboratory Studies (Oxford Ornithology Series)*. Oxford University Press, USA.
- Zhu, M.-L., & Kyprianou, N. (2008). Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocrine-related cancer*, 15(4), 841–9.
- Zivadinovic, D., Gametchu, B., & Watson, C. S. (2005). Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast cancer research : BCR*, 7(1), R101–12.

8. Danksagung

Einen großen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Gahr, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit anfertigen konnte, und meinem direkten Betreuer, Herrn Dr. Falk Dittrich aussprechen. Beide haben mir bei der Planung der Experimente, durch ihre Betreuung und ihre Diskussionsbereitschaft sehr geholfen. Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern meines Promotionskomitees für die Bereitschaft bedanken, meine Arbeit zu begutachten.

Carolina Frankl-Vilches und Moritz Hertel danke ich sehr für ihre Unterstützung, die Einführung in zahlreiche molekularbiologische Analysemethoden und in die Auswertung der Microarray-Daten.

Ein großer Dank geht an Antje Bakker für ihre Anleitung bei der Durchführung der Microarray-Experimente. Weiterhin danke ich Judith Kammerlander, Anja Lorenz und Christina Reusch für die nette und entspannte Atmosphäre im Labor, sowie die Hilfe bei *In-situ*s und Antikörperfärbungen. Ein weiterer Dank geht an Monika Trappschuh und PD Dr. Wolfgang Goymann für die Hilfe bei der Analyse der Hormontiter.

Ein spezielles „Danke“ geht an Susi Seltsmann, Claudia Ramenda, Lisa Gill, Beate Apfelbeck, Carolina Frankl-Vilches, Albertine Leitao, Chiel Vellema, Moritz Hertel, Willi Jensen und Dieter Schmidl. Ihr habt mir sehr geholfen!

Für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Gahr bedanken. Dies gilt insbesondere auch für die Tierpfleger, die uns das Arbeiten mit den Tieren erst ermöglichen.

Ein großer Dank geht an Nicole Hoiss für die Durchführung von Bestellungen und weitere verwaltungstechnische Angelegenheiten.

Meiner Familie möchte ich für ihren Ansporn und die tatkräftige Unterstützung von ganzem Herzen danken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

